

RENATO MASSAAKI HONJI

Controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas do surubim  
do Paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes:  
Pimelodidae) em relação ao ciclo reprodutivo e à  
reprodução induzida em cativeiro

“Control of the hypothalamic-pituitary-gonads axis of the surubim  
do Paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes:  
Pimelodidae) in relation to reproductive cycle and  
induced spawning in captivity”

São Paulo

2011

RENATO MASSAAKI HONJI

Versão corrigida conforme a Resolução CoPGr: 5890

Original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

Controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas do surubim  
do Paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes:  
Pimelodidae) em relação ao ciclo reprodutivo e à  
reprodução induzida em cativeiro

Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências da Universidade de São  
Paulo, para a obtenção de Título de  
Doutor em Ciências, na área de  
Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira

São Paulo

2011

## **Ficha Catalográfica**

Honji, Renato Massaaki

Controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas do surubim do Paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) em relação ao ciclo reprodutivo e à reprodução induzida em cativeiro / Renato Massaaki Honji; Orientadora: Dra. Renata Guimarães Moreira – São Paulo, 2011.

300 pág.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. *Steindachneridion parahybae*; 2. Controle endócrino da reprodução; 3. Eixo hipotálamo-hipófise-gônadas; 4. Reprodução induzida; 5. Hormônio liberador de gonadotropinas; 6. Gonadotropinas; 7. Esteróides sexuais; 8. Desenvolvimento oocitário.

## **Comissão Julgadora**

---

**Dr. Matias Pandolfi**  
*Universidad de Buenos Aires*

---

**Dra. Fabiana L. Lo Nostro**  
*Universidad de Buenos Aires*

---

**Dra. Irani Quagio-Grassiotto**  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho” – campus: Botucatu

---

**Dra. Maria Inês Borella**  
Universidade de São Paulo  
Instituto de Ciências Biomédicas

---

**Dra. Renata Guimarães Moreira**  
Universidade de São Paulo  
Instituto de Biociências

## *Dedicatória*

**Dedico este trabalho com todo meu amor e carinho:**

**- aos meus pais...**

**... por todo o sacrifício que sempre  
fazem pelos seus filhos...**

**... pelo apoio absoluto em todos os  
momentos da minha vida...**

**- à minha adorável *Obatian* (*In  
memorian*)...**

**... pelo amor, carinho, felicidades, e  
apoio incondicional durante o  
tempo que estive entre NÓS.**

**- Aos peixes sacrificados...**

**... sem eles, esta pesquisa seria  
impossível de ser realizada.**

**Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento. É o seu bem mais precioso. Explore, viaje, descubra, conheça...**

**Albert Einstein**

**“A vida é um campeonato permanente. Assim que uma partida termina, começa outra. O prazer não está no descanso, e sim na preparação para a próxima partida”**

**Clarice Lispector**

**Seja a mudança que você quer ver no mundo**

**Dalai Lama**

## *Agradecimentos*

Em primeiro lugar, quero deixar expresso, os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que me ajudaram e que foram fundamentais para que no dia de hoje, eu possa encontrar-me nesta situação, de enorme felicidade. Em momentos como este, em que paramos e pensamos quem são as pessoas que realmente importam; quem nunca importou; quem não importa mais; e quem sempre importará em nossas vidas; eis as verdadeiras razões pelas quais, algumas pessoas do nosso passado sempre estarão presentes e outras que não chegarão ao nosso futuro. Como são muitas as pessoas, se por um acaso eu esquecer alguém, espero que me perdoem.

Ao grande Deus, pela ótima família, pela minha saúde e por me dar diariamente toda a força necessária, e que me sustenta no meu caminhar, por maior que sejam as dificuldades e muito mais... EU TUDO POSSO NAQUELE QUE ME FORTALECE!!!

À professora Dra. Renata Guimarães Moreira, pela incomparável e competente orientação dada a mim, desde o início da minha pós-graduação, no mestrado (2005-2007), até os dias de hoje, que é quando estou prestes a conquistar um título de extrema importância em minha vida, o TÍTULO DE DOUTOR. Essa vitória não é só minha!!! Professora, sem sombra de dúvida, você é uma pessoa digna de respeito; cheia de princípios; uma pessoa admirável e com uma generosidade e dedicação com o que faz; apreço com seus alunos; além da sua inabalável ética humana e profissional. Saiba que seu profissionalismo sempre será o meu maior exemplo, alguém que sempre admiro e vou me inspirar por toda a minha vida acadêmica.

Professora, obrigado novamente por ter acreditado e investido em mim, e como escrito na minha dissertação, “não há como agradecer esses anos de convivência apenas com palavras, mas somente honrando-a”. Eu tenho muita sorte por você ter sido a minha orientadora, e muito orgulho de ter sido o seu primeiro aluno. Além disso, Professora, você oferece a todos os seus alunos, ensinamentos que vão muito além de críticas e sugestões de como ensinar ciências, mas também, me ensinou que as pessoas são diferentes e que é possível conviver e evoluir quando se aprende a respeitá-las como elas são. Agradeço também pela enorme paciência que teve, principalmente em relação à minha prolixidade, espero ter melhorado um pouco do meu mestrado para o doutorado (apesar de não parecer nesta tese

com 300 páginas). Mais uma etapa profissional finalizada, mas a amizade e admiração serão eternas... Enfim, muito obrigado por tudo!!!

Ah... quase esqueci... mais uma etapa será iniciada, agora no Pós-doutorado. Muito obrigado por ter aceitado o convite na supervisão do Pós-doc e por ter ajudado também a conseguir a minha bolsa de Pós-doc!!!

Ao Dr. Matias Pandolfi (*Universidad de Buenos Aires, Argentina*), pela orientação, paciência e amizade. Agradeço por abrir as portas do seu laboratório na Argentina, e por ter-me ensinado várias coisas valiosas para a minha formação acadêmica. Obrigado pela oportunidade de morar em um país que admiro muito, apesar das enormes diferenças de afinidades entre Argentina-Brasil. Espero poder voltar algum dia. Muito obrigado Matias!!!

À Dra. Fabiana Lo Nostro (*Universidad de Buenos Aires, Argentina*), pelo incentivo, sugestões, amizade, e mais, por preocupar-se com todos os detalhes, acadêmicos e pessoais, durante a minha estadia na Argentina. Além do mais, acredito que você não se lembra, mas no dia em que nos conhecemos, lá na UNICAMP (2006), fiquei super nervoso e feliz ao mesmo tempo, pois, você foi o primeiro “paper ambulante” internacional que conheci. Você não faz idéia de como este fato é importante para mim!!! Muito obrigado por tudo Fabiiii...

Ao Danilo Caneppele (biólogo responsável pela piscicultura da Companhia Energética de São Paulo, CESP), por apresentar o surubim do Paraíba e a sua problemática. Obrigado por disponibilizar os reprodutores para a utilização neste estudo, e toda a infra-estrutura necessária para a manutenção dos mesmos. Além de outros estudos paralelos a este trabalho. Muito obrigado Danilo!!!

Junto ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), expressei minha gratidão a todos os professores, pelas disciplinas, conselhos e ensinamentos. Especialmente ao Dr. Carlos Arturo Navas Iannini, pela colaboração, idéias, conselhos, e principalmente pela ajuda com o Projeto Temático, que auxiliou e muito na realização deste trabalho, e também por ajudar no pedido da minha bolsa de pós-doutorado neste mesmo departamento. Agradeço também ao Dr. José Eduardo Bicudo, pelo uso das dependências da sala 311; e ao ZéGui (Dr. José Guilherme S. C. M. Berlinck), pelos momentos de descontração nos corredores, na secretaria, na copa e no nosso laboratório. Obrigado pelos elogios: “rato que Ronji; usa sempre bonés sofisticados e de alta tecnologia,

que deve servir para esconder a cabeça fungada; o que vocês acham de um aluno que usa bonés combinando com o restante da roupa?”. Por outro lado, pelo menos eu não sou susceptível à corrupção por NUTELLA!!!

À Banca de Qualificação, Dr. Gilberto Fernando Xavier (IB-USP), Dr. José Eduardo de Carvalho (Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP) e a Dra. Maria Aparecida Visconti (IB-USP), pelo pronto atendimento ao convite, pela disponibilidade, correção, sugestões, e principalmente pela oportunidade de aprendizado.

Meu sincero obrigado aos Coordenadores da Pós-Graduação, Dr. José Guilherme de Souza Chauí Mattos Berlinck e Dr. Gilberto Fernando Xavier, pelos serviços burocráticos quando necessários.

A todos os integrantes do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA), desde os mais novos (INICIAÇÃO CIENTÍFICA), que nos contagiam com suas energias, até os mais “velhos”... Paulo Mello, Bruno Araújo, Letícia Yoshida, Lilian Cortez, Carolina Pozzebom, Bianca Kida, Gabriela Brambila, Larissa Suzuki, Juliane Suzuki, Andreone Medrado, Aline Gomes, Amanda Narcizo, Carlos Eduardo (Jaboti), Carlos Tolussi (Kadu), Cristiéle Ribeiro, Jandyr Almeida, Tiago, e Vanessa. Obrigado por sempre estarem presentes, auxiliando no laboratório ou nas coletas ou na bancada, enfim... em todos os momentos nestes anos de convivência. Foi muito bom trabalhar com vocês. Muito obrigado também ao nosso técnico Vagner, apesar de ser são-paulino, sempre foi muito prestativo; e a Isabel Pereira, embora aluna do Dr. Carlos Navas, nos auxiliou e muito, com o Projeto Temático.

Paulo e Bruno, valeu pelas “escapadas” diárias ao C.A. da Bio para as partidas de “sinucas” e brejas... Valeu também pela cumplicidade e maldades no dia-a-dia, no LAMEROA, que fazem o nosso trabalho muito mais divertido!!!!

A todos os funcionários do IB-USP pelos serviços prestados. Especialmente à Roseli Santos (secretária da Pós-Graduação do Depto de Fisiologia), Gisele Ortoli e a Marcilene (respectivamente, secretária e técnica administrativa do Depto de Fisiologia). Muito obrigado também, Erika, Cynthia, Vera e Helder (secretárias (o) do Programa de Pós-Graduação do IB-USP), pelos serviços burocráticos, sempre eficientes, e prontos para o melhor atendimento.



Agradeço também a todos os funcionários da biblioteca do IB-USP pelas bibliografias quando necessárias.

À professora Dra. Maria Inês Borella do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP), e aos seus alunos, pela disponibilidade e colaboração em alguns momentos deste trabalho. Muito obrigado professora, nunca te esquecerei, pois, foi em seu laboratório que aprendi a fazer os cortes histológicos e reações de imuno-histoquímica. Sinto muita falta das nossas conversas naquelas principais horas, ou seja, na hora do café!!!

À professora Dra. Neuza Sumico Takahashi do Instituto de Pesca (Secretaria da Agricultura e Abastecimento) pelos ensinamentos, auxílios, conselhos e principalmente pela oportunidade de aprendizado.

Ao sempre presente Dr. Alexandre Hilsdorf (Universidade de Mogi das Cruzes), sempre eficiente e colaborador de muitos projetos do LAMEROA. Agradeço também por sempre se lembrar de nós, alunos da Profa. Renata, para fazer algum trabalho na Piscicultura de Ponte Nova.

Ao Dr. André Martins Vaz dos Santos, pois muito do que sou hoje, deve-se a este professor que admiro muito. Sem sombra de dúvida, esta etapa finaliza um ciclo que se iniciou com este professor, porque para ser Doutor, eu tive que ser primeiro licenciado e bacharel, e a base de tudo isso, eu adquiri seguindo os seus passos, exemplos, e imitando-o em tantas coisas que nem imagina que admiro, inclusive na minha proximidade. Tudo começou antes mesmo das primeiras aulas de Biologia Pesqueira e aulas práticas de Zoologia, na Universidade Santa Cecília (UNISANTA), mas naquele dia, em que entreguei o meu currículo para uma seleção de estágio no Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP) com o Dr. Eduardo Almeida (que por destino, não deu certo), e que, futuramente, para a minha sorte, comecei a minha iniciação científica sob a sua orientação. Sou extremamente grato por tudo, apesar da distância e “falta” de tempo, meu carinho, admiração e gratidão serão eternos. Professor, se por algum motivo, eu tivesse de começar tudo de novo, saiba que escolheria novamente você, para ser o meu orientador acadêmico. MUITO OBRIGADO POR TUDO!!!!

*Los nuevos amigos del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina: Matias Pandolfi, Paula Vissio, Maximiliano Canepa (Maxiiii), Rodrigo, Yanina, Fernando, Graciela Vazquez, Graciela Guerrero, Cristina, Fabiana (Fabiini), Griselda, Ceci, Felipe, Dani, Mariana Guerreño, Mariana Fossati, Noelia, Martín y Virgínia. Estoy muy agradecido a todos ustedes, especialmente por la hospitalidad sin igual, en laboratorio, apoyo constante y el aprendizaje durante mi pasantía en Argentina. Un agradecimiento especial a Mariana Fossati por la enseñanza del español. Besos y abrazos a todos.*

*Durante mi passantía en Uruguai, estoy muy agradecido: Federico Achaval, Inês da Rosa, Zulema L. Coppes Petricorena, Denise Vizziano, Gustavo Somoza, Julien Bobe y Julio Berbejillo.*

A Dra. Irani Quagio-Grassiotto da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP, Botucatu), por abrir as portas de seu laboratório para a realização de algumas análises, pelos ensinamentos e amizade. Muito obrigado professora!!! Agradeço também ao técnico Vicente, pelo ensinamento de algumas técnicas. Além do mais, gostaria de agradecer a todos os alunos deste laboratório, principalmente à Talita Mazzoni e ao Júlio Santana, pela ajuda, conversas, e “aprendizado e divertimento” em Macaé (RJ). Lembram: “Que que eu tô fazendo aqui???”

Um agradecimento especial a todos os integrantes da minha “primeira casa científica”, Laboratório de Ictiofauna do IO-USP, principalmente para a professora Dra. Carmen Lúcia Del Bianco Rossi-Wongtschowski e ao professor Dr. André Martins Vaz dos Santos. Muito obrigado pelo início da minha formação acadêmica. Sem vocês eu nunca iria saber como se sacrifica, identifica e reconhece as estruturas abdominais (principalmente as gônadas) de um peixe.

Aos pesquisadores Dr. Henk Goos (*Universiteit Uthrecht, The Netherland*), Dr. Akio Shimizu (*Institute of Fisheries Science, Japan*) e Dr. Gustavo M. Somoza (*Instituto Tecnológico de Cháscomus, Argentina*), por doarem gentilmente os anticorpos e que, sem eles, grande parte desta pesquisa não poderia ter sido realizada.

O aprendizado e as novas idéias para a minha linha de pesquisa (principalmente para o Pós-doutorado) se devem aos pesquisadores Dr. Rüdger W. Schulz e Dr. Rafael H. Nóbrega (*Universiteit Uthrecht, The Netherland*), Dr. Gustavo M. Somoza (*Instituto Tecnológico de Cháscomus, Argentina*), Dra. Denise Vizziano (*Universidad de la República, Uruguay*) e Dr. Carlos A. Strüßmann e Dr. Ricardo S. Hattori (*Tokyo University, Japan*). Muito obrigado a todos!!!

A Companhia Energética de São Paulo (CESP), Paraibuna-SP, pelo suporte logístico, financeiro e técnico. Agradeço também pela disponibilidade da piscicultura para a realização deste estudo. Deixo aqui expresso a minha gratidão aos amigos da CESP: Danilo, Lúcia, Willian, Vicente, José Ferreira, Benedito, Júlio Cesar, Ielzo e Milton.

Na Universidade Santa Cecília (UNISANTA), cabe agradecer aos seguintes professores: Dr. Luiz A. Zavala-Camin, Dr. Otto B. F. Gadig, Dr. Laércio J. Gerbi e Dr. André M. Vaz dos Santos. Deixo aqui expresso também a minha grande admiração e respeito a esses professores que tive durante a minha graduação.

A possibilidade de realizar o doutorado deveu-se ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (6 meses de bolsa de doutorado, Processo: 142561/2007-0), da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (3 anos de bolsa de doutorado, Processo: 2007/55494-7), e finalmente, do Programa de Mobilidade Internacional de Pós-graduandos, Programa Santander/Banespa (pela bolsa concedida para o estágio na Argentina).

Ao Projeto Temático “Effects of global climate changes of the brazilian fauna: a conservation physiology approach” (FAPESP, Processo: 2008/57687-0), coordenado pelo Dr. Carlos A. Navas (IB-USP) por todo apoio financeiro durante o desenvolvimento do presente estudo.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Fisiologia do IB-USP.

Agradeço aos pais do Jaboti (Sr. Garcia e Sra. Ivani), pela hospitalidade em sua casa em Jaboticabal, São Paulo-SP, durante a disciplina no CAUNESP (Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Jaboticabal). Obrigado Sr.

Garcia pelas longas conversas (mais ou menos em japonês, pois eu não sei falar esta língua e aprendi muito com o Sr.!!!).

Por último, a realização deste doutorado só foi possível devido a uma sólida estrutura familiar, que eu prezo tanto. Muito obrigado ao meu pai, Nelson Massato Honji, à minha mãe, Shizuko Honji, às minhas irmãs, Midori, Mieko, Andréa e Sue, ao meu sobrinho Lucas, sobrinha Aya e minha afilhada Tammy. Essa vitória não é só minha, mas também de vocês. Espero poder retribuir e lhes oferecer outros momentos mágicos e de orgulho como este Título. Desculpe-me pela distância, momentos de estresse e de mau humor nesses últimos meses de tese... Expresso também minha gratidão aos meus familiares sempre presentes, mesmo que distantes.

A todos os que não foram mencionados, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO A TODOS!!!!!!!!!!!!!!

*Renato Massaaki Honji*

---

## Índice

Resumo geral	pág. VII
General abstract	pág. IX
<i>Capítulo 1</i>	pág. 1
1. Introdução geral e Revisão bibliográfica	pág. 2
1.1. Endocrinologia e neuroendocrinologia: um pouco de história	pág. 2
1.2. Neuroendocrinologia e reprodução em peixes teleósteos	pág. 3
1.3. Hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH)	pág. 11
1.3.1. Acerca da nomenclatura das diferentes formas moleculares de GnRH	pág. 17
1.3.2. Origem embriológica das diferentes formas moleculares de GnRH	pág. 18
1.4. Hipófise, células gonadotrópicas (GtHs)	pág. 20
2. Breve descrição do modelo biológico e a importância de <i>Steindachneridion parahybae</i>	pág. 24
3. Objetivo geral	pág. 25
3.1. Objetivos específicos	pág. 25
3.2. Capítulos	pág. 26
4. Referências bibliográficas	pág. 27
Tabelas: Capítulo 1	pág. 43
Figuras: Capítulo 1	pág. 47
Anexos	pág. 63
Anexo – 1	pág. 63
Anexo – 2	pág. 65

---

<i>Capítulo 2</i>	pág. 67
Desenvolvimento ovariano e perfil de esteróides sexuais plasmáticos em <i>Steindachneridion parahybae</i> (Siluriformes: Pimelodidae), durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução.	pág. 68
Resumo	pág. 68
1. Introdução	pág. 69
2. Material e métodos	pág. 72
2.1. Desenho experimental e coleta dos animais	pág. 72
2.2. Análise histológica dos ovários	pág. 73
2.3. Caracterização dos estádios reprodutivos	pág. 74
2.4. Análises dos esteróides sexuais	pág. 74
2.5. Análises estatísticas	pág. 75
3. Resultados	pág. 75
3.1. Análise histológica dos ovários	pág. 75
3.2. Caracterização dos estádios reprodutivos	pág. 77
3.3. Índice gonadossomático (IGS)	pág. 77
3.4. Análises dos esteróides sexuais	pág. 78
4. Discussão	pág. 79
5. Agradecimentos	pág. 89
6. Referências bibliográficas	pág. 89
Tabelas: Capítulo 2	pág. 99
Figuras: Capítulo 2	pág. 103
 <i>Capítulo 3</i>	 pág. 121
Células hipofisárias de fêmeas de <i>Steindachneridion parahybae</i> (Siluriformes: Pimelodiade) durante a oogênese e à reprodução induzida em cativeiro.	
	pág. 122
Resumo	pág. 122
1. Introdução	pág. 123
2. Material e métodos	pág. 125
2.1. Desenho experimental e coleta dos animais	pág. 125
2.2. Análise histológica da hipófise	pág. 126
2.3. Análise de imuno-histoquímica da glândula hipofisária	
	pág. 127

2.3.1. Anticorpos	pág. 127
2.3.2. Recuperação antigênica	pág. 127
2.3.3. Análise de imuno-histoquímica	pág. 127
2.4. Análise de <i>Western blot</i>	pág. 128
2.5. Análise de dados	pág. 130
2.5.1. Análise semiquantitativa da densidade óptica	pág. 130
2.5.2. Análise semiquantitativa do diâmetro celular e nuclear	pág. 130
2.6. Análises estatísticas	pág. 130
3. Resultados	pág. 131
3.1. Análises histológicas, imuno-histoquímicas e <i>Western blot</i>	pág. 131
3.2. Análise semiquantitativa de densidade óptica e diâmetro celular e nuclear	pág. 133
4. Discussão	pág. 134
5. Agradecimentos	pág. 143
6. Referências bibliográficas	pág. 143
Tabelas: Capítulo 3	pág. 153
Figuras: Capítulo 3	pág. 157
<i>Capítulo 4</i>	pág. 171
Caracterização, distribuição e localização das diferentes formas do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) no encéfalo e na hipófise de <i>Steindachneridion parahybae</i> (Siluriformes: Pimelodidae) durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução em cativeiro.	pág. 172
Resumo	pág. 172
1. Introdução	pág. 173
2. Material e métodos	pág. 176
2.1. Desenho experimental e coleta dos animais	pág. 176
2.2. Análise histológica do encéfalo	pág. 177
2.3. Análise de imuno-histoquímica	pág. 177
2.4. Análise de <i>Western blot</i>	pág. 178
2.5. Análises de dados	pág. 180

2.5.1. Análise semiquantitativa da densidade óptica	pág. 180
2.5.2. Análise semiquantitativa da área nuclear e celular	pág. 180
2.6. Análises estatísticas	pág. 180
3. Resultados	pág. 181
3.1. Análises histológicas, imuno-histoquímicas e <i>Western blot</i>	pág. 181
3.2. Análise semiquantitativa de densidade óptica e área celular e nuclear	pág. 184
4. Discussão	pág. 185
5. Agradecimentos	pág. 195
6. Referências bibliográficas	pág. 195
Tabelas: Capítulo 4	pág. 205
Figuras: Capítulo 4	pág. 209

*Capítulo 5 (manuscrito preparado para o envio: Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB))*  
pág. 235

Caracterização macroscópica das gônadas e reprodução induzida em cativeiro de <i>Steindachneridion parahybae</i> (Teleostei: Siluriformes), uma espécie ameaçada de extinção.	pág. 236
Resumo	pág. 236
Abstract	pág. 237
1. Introdução	pág. 237
2. Material e métodos	pág. 238
3. Resultados e Discussão	pág. 240
4. Agradecimentos	pág. 244
5. Referências bibliográficas	pág. 244
Tabelas: Capítulo 5	pág. 247
Figuras: Capítulo 5	pág. 251



*Capítulo 6 (manuscrito enviado para publicação: Neotropical Ichthyology (NI)*

	pág. 259
Embryonic development and larval stages of <i>Steindachneridion parahybae</i> (Siluriformes: Pimelodidae). Implications for the conservation and rearing of this endangered Neotropical species.	pág. 260
Abstract	pág. 260
Resumo	pág. 261
Introduction	pág. 261
Material and Methods	pág. 263
Broodstock selection, hormonal induction and spawning	pág. 263
Egg and larval analysis	pág. 264
Terminology for embryonic development	pág. 265
Results	pág. 265
Water quality	pág. 265
Broodstock selection, hormonal induction and spawning	pág. 266
Egg and larval analysis	pág. 266
Egg stage	pág. 266
Larval stage with yolk sac and larval stage – exogenous feeding	pág. 266
Histological analysis	pág. 267
Discussion	pág. 268
Acknowledgments	pág. 272
Literature Cited	pág. 272
Tables: Chapter 6	pág. 277
Figures: Chapter 6	pág. 281

*Capítulo 7* pág. 295

Eixo hipotálamo-hipófise-gônadas de <i>Steindachneridion parahybae</i> (Siluriformes: Pimelodidae).	pág. 296
Referências bibliográficas	pág. 299



## Resumo geral

*Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) é um bagre de água doce, endêmico da Bacia do Rio Paraíba do Sul (Brasil), e seriamente ameaçado de extinção. Fêmeas de *S. parahybae* quando criadas em cativeiro apresentam uma falha na maturação final, ovulação e desova. Este trabalho teve como objetivo analisar o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, responsável pelo controle neuroendócrino da reprodução de forma a aumentar o conhecimento deste sistema em animais de cativeiro. Fêmeas adultas foram amostradas mensalmente (exceto nos meses de inverno) entre janeiro/2008 e março/2009 na piscicultura da Companhia Energética de São Paulo. As análises macroscópicas e microscópicas dos ovários permitiram classificar o desenvolvimento ovariano em três estádios de maturação: pré-vitelogênico (crescimento primário), vitelogênico (crescimento secundário) e regressão; e cinco fases de desenvolvimento oocitário foram identificadas: oogônia, oócito perinucleolar, oócito alvéolo cortical, oócito vitelogênico e oócito atrésico. Após a indução à reprodução artificial, a maturação final foi alcançada e os folículos pós-ovulatórios foram identificados. Em *S. parahybae*, o período reprodutivo foi evidente entre novembro e fevereiro e o desenvolvimento oocitário foi do tipo sincrônio em grupo, sugerindo-se que esta espécie apresenta múltiplas desovas durante este período. Os perfis plasmáticos de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) e testosterona (T) foram fundamentais no desenvolvimento oocitário, e a produção destes esteróides sexuais parece não ser afetada no bloqueio da reprodução em cativeiro. Entretanto, as concentrações de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona ( $17\alpha$ -OHP), durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução, sugerem que a falha reprodutiva de *S. parahybae* esteja relacionada com uma disfunção nos progestágenos, principalmente na conversão do  $17\alpha$ -OHP em  $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (*Maturation-Inducing Steroid*, MIS), este último considerado como hormônio da maturação final e ovulação em teleósteos. O andrógeno 11-cetotestosterona (11-KT) apresentou maior concentração no estádio vitelogênico e nas fêmeas induzidas à reprodução, sugerindo um envolvimento deste andrógeno na reprodução de *S. parahybae*. No entanto, o sítio de síntese e ação, assim como, as possíveis funções de 11-KT ainda permanecem pouco investigadas em fêmeas. No sistema encefálico foram caracterizadas duas formas do hormônio-liberador de gonadotropinas (GnRH), *catfish* GnRH (cfGnRH) e *chicken-II* GnRH (cGnRH-II). cfGnRH foi identificado em toda região ventral do telencéfalo e em várias regiões ventrais do diencéfalo, e o cGnRH-II foi observado na região do tegumento do cérebro médio, próximo ao terceiro ventrículo. O cfGnRH está intimamente

relacionado com a modulação da atividade da hipófise, e ao contrario, o cGnRH-II (que não inerva a hipófise), provavelmente está relacionado com a neuromodulação e/ou comportamento reprodutivo em *S. parahybae*. A hipófise é composta pela neuro-hipófise (NH) e adeno-hipófise (ADH), sendo que, a ADH é subdividida em: “rostral pars distalis” (RPD), “proximal pars distalis” (PPD) e “pars intermedia” (PI). Nestas sub-regiões da ADH foi caracterizado o hormônio folículo estimulante (FSH-18KDa), o hormônio luteinizante (LH-19KDa), o hormônio de crescimento (GH-21KDa), a prolactina (PRL-22KDa) e a somatolactina (SL-26KDa). Os resultados semiquantitativos de GH, PRL e SL sugerem que estes hormônios estejam envolvidos indiretamente na reprodução e podem ter um papel fisiológico na regulação e/ou na modulação de mecanismos associados à reprodução de *S. parahybae*. O padrão de síntese/liberação de FSH durante o ciclo reprodutivo foi adequado para estimular a síntese/liberação de E<sub>2</sub> para promover a vitelogênese, que foi constatada nos ovários, pela presença de oócitos vitelogênicos. Desta forma, sugere-se que a falha na reprodução em fêmeas de *S. parahybae* quando mantidas em cativeiro, provavelmente foi devido às disfunções na síntese/liberação dos progestágenos, modulado pelo LH, e/ou falhas na conversão de 17 $\alpha$ -OHP em MIS em fêmeas vitelogênicas. Do mesmo modo, os nossos dados indicam que o cfGnRH, responsável pela modulação de LH, é sintetizado no estágio vitelogênico, mas como diminuiu nas fêmeas induzidas à reprodução, sugere-se que o cfGnRH também não foi sintetizado/liberado em quantidade suficiente. Esses dados, somados ao conhecimento dos eventos que acompanham o desenvolvimento larval, fornecem subsídios para aperfeiçoar o método de reprodução induzida e larvicultura de *S. parahybae* em pisciculturas de conservação, contribuindo para um melhor desempenho reprodutivo dessa espécie em cativeiro, o que auxiliará no programa de repovoamento na Bacia do Rio Paraíba do Sul.

---

## General abstract

*Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) is a freshwater catfish, endemic to the Paraíba do Sul River Basin (Brazil), and seriously threatened. *S. parahybae* females, when reared in captivity, exhibit failures in final maturation, ovulation and spawning. This study aimed to analyze the hypothalamus-pituitary-gonads axis, responsible for the neuroendocrine control of reproduction, with the goal to increase the knowledge of this system in domesticated animals. Adult females were sampled monthly (except in winter months) from January/2008 to March/2009 in the *Companhia Energética de Sao Paulo* fish farm. The macroscopic and microscopic analyses of the ovaries allowed classifying the ovarian development in three maturation stages: pre-vitellogenic (primary growth), vitellogenic (secondary growth) and regression; and five oocyte development phases: oogonia, perinucleolar oocyte, cortical alveolar oocyte, vitellogenic oocyte and atretic oocyte. After the artificial induction to reproduction, the final maturation was achieved and the post-ovulatory follicles were identified. In *S. parahybae*, the reproductive period was evidenced from November to February and the oocyte development was synchronic in group, suggesting that this species shows multiple spawns during this period. The plasma profiles of  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) and testosterone (T) were essential in oocytes development, and the production of these sexual steroids seems not to be the cause of reproduction failure in captivity. However, the  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone ( $17\alpha$ -OHP) concentration profile during the reproductive cycle and after the induced spawning, suggests that reproductive failure of *S. parahybae* can be related to progestogens dysfunction, mainly in the conversion of  $17\alpha$ -OHP in  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (Maturation-Inducing Steroid, MIS), the latter considered as the final maturation and ovulation hormone in teleosts. The androgen 11-ketotestosterone (11-KT) level was higher in the vitellogenic stage and in the females induced to spawn, suggesting an involvement of this androgen in *S. parahybae* reproduction. However, the site of synthesis and action, and the possible role of 11-KT remain unknown in females. In the brain system, two forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) were characterized, catfish GnRH (cfGnRH) and chicken-II GnRH (cGnRH-II). cfGnRH was identified throughout the ventral forebrain and cGnRH-II was observed in the midbrain tegument, close to the third ventricle. cfGnRH is closely related to the modulation of the pituitary activity, unlike that, cGnRH-II (which does not innervate the pituitary gland), is probably related to neuromodulation and/or reproductive behavior in *S. parahybae*. The pituitary is composed by the neurohypophysis

(NH) and the adenohypophysis (ADH), whereas, the ADH is subdivided into: "rostral pars distal" (RPD), "proximal pars distal" (PPD) and "pars intermedia" (PI). In these ADH sub regions the following hormones were characterized: the follicle-stimulating hormone (FSH-18KDa), the luteinizing hormone (LH-19KDa), the growth hormone (GH-21KDa), the prolactin (PRL-22KDa), and the somatolactin (SL-26KDa). The semi-quantitative data of GH, PRL and SL suggest that these hormones are indirectly involved in reproduction and may have a physiological role in regulating and/or modulation of the mechanisms associated with reproduction of *S. parahybae*. The pattern of synthesis/release of FSH during the reproductive cycle was adequate to stimulate the synthesis/release of E<sub>2</sub> to promote the vitellogenesis, which was confirmed in the ovaries, due to the presence of vitellogenic oocytes. Therefore, it is suggested that the reproductive failure in *S. parahybae* females when reared in captivity, was probably due to dysfunctions in progesterone synthesis/release, modulated by LH, and/or failure in the conversion of 17 $\alpha$ -OHP in MIS in vitellogenic females. Likewise, our data proposed that cfGnRH, responsible for the modulation of LH, is synthesized in the vitellogenic stage, but, as decreased in females induced to spawn, it is suggested that cfGnRH was also not synthesized/released sufficiently. These data, together with the knowledge of the events that followed the larvae development, subsidizes the improvement of the artificial reproduction method of *S. parahybae* in conservation fish farms, contributing to a better reproductive performance of this species in captivity, which will allow the establishment of a more effective re-introduction program in the Paraíba do Sul River Basin.



Reef fish ID: Florida, Caribbean, Bahamas. Interactive ed. ReefNet.

*1*

## *CAPÍTULO*

---

Introdução e revisão da literatura

Objetivo geral

Capítulos

Referências bibliográficas

Anexos

Honji, R. M. & Moreira, R. G.

## 1. Introdução geral e Revisão bibliográfica

### *1.1. Endocrinologia e neuroendocrinologia: um pouco de história*

A endocrinologia é uma área específica de uma das disciplinas mais amplas da biologia, conhecida como fisiologia. Considerando que a fisiologia é o estudo dos processos biológicos que permitem a vida existir e funcionar, a fisiologia animal comparada tem um foco nas comparações e contrastes dos mecanismos, processos ou respostas fisiológicas de diferentes animais (evolutivamente), ou de uma simples espécie, que estão submetidas a diferentes condições sejam elas: naturais ou artificiais (Withers, 1992; Norris, 2007). Já a neuroendocrinologia pode ser caracterizada pela intersecção entre a neurobiologia e a endocrinologia, ou seja, é o estudo da modulação exercida pelo cérebro sobre o sistema endócrino e vice-versa, o estudo dos efeitos exercido pelo sistema endócrino sobre o cérebro (Zohar et al., 2010).

As glândulas endócrinas, ou glândulas de “secreção interna” secretam os produtos sintetizados em seu interior na corrente sanguínea e essas moléculas funcionam como sinais químicos nos organismos. Esses produtos de secreção, também denominados de hormônios, assim como os estudos das glândulas endócrinas, começaram a ser pesquisados há cerca de 100 anos atrás (Norris, 2007). Inicialmente, as atividades das glândulas eram evidenciadas através de cortes histológicos, e que estavam relacionadas com um determinado processo fisiológico em um dado animal, e que, a remoção e/ou destruição deste tecido, interromperia ou modificaria este processo fisiológico, que posteriormente, era restaurado quando se reimplantava o tecido ou quando era injetado um extrato da mesma glândula (Guyton & Hall, 2006).

O estudo da neuroendocrinologia em mamíferos, especialmente em relação ao conceito de que o encéfalo controla as funções hipofisárias, está bem estabelecido na literatura (Somoza et al., 2002a; Guyton & Hall, 2006). Segundo Zohar et al. (2010), este conceito foi estabelecido depois da Segunda Guerra Mundial, com os estudos propondo que fatores liberados pelo encéfalo eram transportados pela corrente sanguínea até a glândula hipofisária (conhecida também como pituitária) e estimularia a liberação de substâncias por esta glândula (Donovan & Harris, 1954). Primeiramente, as substâncias sintetizadas pelo sistema nervoso eram denominadas de fatores, até que, sua estrutura química específica fosse conhecida e passaram a ser denominadas de hormônios ou neuro-hormônios (Guyton & Hall, 2006; Norris, 2007). Este conceito de que neurônios possuíam atividade secretora, foi



denominado de neurosecreção na década de 30 (Scharrer, 1932).

No grupo dos peixes, o tema neuroendocrinologia é um assunto mais recente, e as primeiras informações sobre a relação do hipotálamo e hipófise neste grupo de animais, foram obtidas em experimentos de laboratórios, observando-se apenas a atividade das células hipofisárias isoladamente, ou seja, analisando essas atividades celulares da glândula hipofisária, desconectadas do encéfalo (Olivereau & Ball, 1966). Outros estudos posteriores a esta época, apresentaram pela primeira vez, em peixes, que extratos encefálicos estimulavam as células hipofisárias em carpas (*Cyprinus carpio*) (Breton & Weil, 1973). Estes estudos foram considerados os pioneiros em neuroendocrinologia da reprodução em peixes, sendo que, passados aproximadamente 35 anos, apesar de grandes progressos na área de neuroendocrinologia em peixes, vários tópicos ainda permanecem incertos.

### 1.2. Neuroendocrinologia e reprodução em peixes teleósteos

Como abordado anteriormente, em geral, a neuroendocrinologia em peixes, é um assunto recente se compararmos este tema com outros vertebrados (especificamente com os mamíferos). Neste sentido, uma abordagem geral em peixes se faz necessária para posteriormente entendermos a fisiologia do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas em teleósteos.

Levando em consideração apenas a diversidade de vertebrados (aproximadamente 54711 espécies), temos respectivamente (Pough et al., 2003): ~9% mamíferos, ~14% répteis, ~18% aves, ~8% anfíbios e ~51% peixes. Como podemos observar, os peixes são os representantes mais numerosos e diversos entre os vertebrados, englobando mais de 50% deste grupo (Moyle & Cech, 2003; Nelson, 2006). Segundo Nelson (2006), são conhecidas 27977 espécies viventes de peixes que ocupam os mais diversos ambientes aquáticos, ocorrendo desde as altas altitudes até as fossas submarinas dos oceanos. Em relação à sua distribuição, 58% são marinhos, 41% são dulciaquícolas e 1% vive entre esses dois ambientes, ou seja, essas espécies realizam migrações entre o ambiente marinho e o ambiente de água doce (Wootton, 1990).

Atualmente, duas linhagens de peixes viventes são identificadas (Fig. 1), os chamados *Sarcopterygii* e os *Actinopterygii* (Nelson, 1994, 2006). O grupo *Sarcopterygii* compreende poucas espécies (Subclasses: *Coelacanthomorpha* e *Dipnotetrapodomorpha*), entretanto, possuem muita importância em estudos evolutivos, pois, apresentam relação com a história da origem dos vertebrados, especificamente com os tetrápodos e seus descendentes (Pough et al., 2003). O grupo *Actinopterygii* engloba a maioria dos peixes ósseos, e é predominante desde a era Paleozóica (Fig. 1) (Pough et al., 2003; Nelson, 2006). Dentro deste grupo, cerca de 98%

são peixes da infraclasse *Teleostei* (teleósteos), que constitui um dos grupos mais abundante e diversificado dentre os chamados peixes (Fig. 2) (Nelson, 1994, 2006). Adicionalmente, dentro dos teleósteos, os *Osteoglossomorpha* (Osteoglossiformes), os *Clupeomorpha* (Clupeiformes), os *Ostariophysi* (principalmente: Siluriformes, Cypriniformes e Characiformes), os *Protacanthopterygii* (principalmente: Salmoniformes), e os *Acanthopterygii* (principalmente: Mugiliformes, Atheriniformes, Cyprinodontiformes e Perciformes) (Nelson, 1994, 2006), são os grupos de peixes de maiores interesses em pesquisas dentro dos teleósteos, tanto em relação aos aspectos biológicos como evolutivos.

O sucesso do grupo dos peixes é atribuído à duplicação do genoma, um evento que possivelmente ocorreu em um ancestral do grupo (Venkatesh, 2003), e como resultado, acarretou em uma série de adaptações fisiológicas, anatômicas, morfológicas, comportamentais entre outras características relacionadas aos processos de respiração, nutrição, osmorregulação, flutuação, percepção sensorial e reprodução (Hoar, 1969; Wootton, 1990; Moyle & Cech, 2003; Zavala-Camin, 2004). No que diz respeito apenas à reprodução, os peixes são ótimos exemplos de complexidade reprodutiva e apresentam as mais variadas estratégias, como as diferentes formas anatômicas observadas nas gônadas entre as espécies e entre as diferentes ordens; as diferentes formas de liberação dos gametas para a fertilização externa, como por exemplo, sincrônico e assincrônico; desenvolvimento de diferentes órgãos especializados para a fertilização interna (como por exemplo: gonopódios e cláspes); as diferentes formas de cuidado com a prole (guardadores e não guardadores de ovos e larvas); além das diferentes formas de construções de ninhos (Wootton, 1990; Vazzoler, 1996; Lowe-McConnell, 1999; Hochachka & Somero, 2002; Moyle & Cech, 2003; Zavala-Camin, 2004); e a migração reprodutiva, seja ela, nas formas de “piracema” ou naquelas longas migrações observadas nas espécies de salmão do pacífico (gênero *Oncorhynchus* spp.) (aproximadamente, 1500 km, Ueda, 2010) e nas enguias (gênero *Anguilla* spp.) (aproximadamente, 6000 km, Bruijs & Durif, 2009), ou seja, entre os mares e os rios e/ou vice-versa, que são acompanhadas por grandes alterações osmóticas e metabólicas, além das alterações reprodutivas.

Por conseguinte, os estudos com reprodução em peixes sempre apresentaram um desafio especial para os pesquisadores, devido a esse grande número de espécies viventes, as constantes descobertas de novas espécies, a distribuição mundial, e a enorme variedade de estratégias reprodutivas, no entanto, a reprodução sexuada em peixes, até mesmo em vertebrados, é um processo muito conservado e está ao mesmo tempo adaptado a diferentes condições (naturais e/ou artificiais). Apesar desta grande variedade de habitat e ciclos de vida

especializados que os peixes apresentam, a reprodução está regulada por fatores nervosos e endócrinos, e que podem apresentar ações diferentes ou interagir uns com outros de maneiras distintas ou até mesmo em diferentes períodos de tempo (Norris, 2007). Além disso, a coordenação destes fatores nervosos e endócrinos com os sinais ambientais externos permite a sincronização dos reprodutores aptos a este processo com as condições ambientais adequadas para o momento propício à reprodução, e conseqüentemente, garantindo uma maior sobrevivência da prole (Trudeau, 2006).

De uma forma geral, cada indivíduo de uma população dispõe de um sistema que recebe as informações procedentes do ambiente externo (sinais ambientais) e internos do organismo (eventos fisiológicos), as integram, regulam, e resultam em um estado endócrino ótimo, que por sua vez, desencadeiam todos os eventos fisiológicos que conduzirá a uma reprodução bem sucedida (Trudeau, 2006). A grande maioria dos peixes apresenta o processo reprodutivo modulado pelos fatores ambientais, como por exemplo, a temperatura, o fotoperíodo, a pluviosidade, entre outros parâmetros. No entanto, as múltiplas e complexas interações hormonais entre os órgãos sensoriais e os reprodutivos, associados ao evento da reprodução, são proporcionadas endogenamente por um sistema endócrino, envolvendo fundamentalmente a participação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Fig. 3), que sintetiza e libera, os hormônios liberadores de gonadotropinas (GnRHs), as gonadotropinas (GtHs), hormônio folículo estimulante (FSH) e/ou hormônio luteinizante (LH), os 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 gonadotropinas, 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). Em condições adequadas para os animais, todo este processo ocorre naturalmente, com o desenvolvimento das gônadas, maturação, liberação e fertilização dos gametas, sendo que em geral, em peixes, a desova e a fertilização ocorrem no ambiente externo (Rocha & Rocha, 2006). Os ovos fertilizados originam embriões e posteriormente larvas, que crescem e se tornam adultos, reiniciando o ciclo.

Neste contexto é sabido que o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas apresenta vários processos fundamentais para a perpetuação das espécies, e neste caso, uma revisão na literatura se faz necessária sobre o funcionamento fisiológico básico deste eixo (Fig. 3). A fisiologia da reprodução em fêmeas de peixes teleósteos pode ser sintetizada da seguinte forma (Blázquez et al., 1998; Somoza et al., 2002a; Weltzien et al., 2004; Levavi-Sivan et al.,

2010; Lubzens et al., 2010; Zohar et al., 2010): a partir do momento em que a idade e o peso mínimo são atingidos para o início da reprodução, os estímulos sociais (densidade da população, proporção de sexo, presença de ambos os sexos) e as alterações ambientais como o fotoperíodo, a temperatura e, possivelmente as chuvas nas espécies neotropicais, são captadas pelos sistemas sensoriais (através dos olhos, pineal, narinas, receptores cutâneos, entre outros), analisadas e convertidas em sinais eletroquímicos e são transmitidos via neurônios sensoriais até o hipotálamo. Este último, por sua vez, por meio de distintos circuitos neuronais libera neuro-hormônios específicos na hipófise, regulando a atividade desta glândula. Em teleósteos, devido à ausência de um sistema porta-hipofisário (como identificado em mamíferos), os neuro-hormônios chegam à hipófise através de inervação direta. Estes fatores ambientais citados acima estimulam especificamente o hipotálamo a sintetizar e liberar o GnRH, que estimula as células gonadotrópicas na hipófise a sintetizar e liberar o FSH, que via corrente sanguínea chega aos folículos ovarianos em desenvolvimento, e nas células da teca, converte o colesterol em testosterona (etapa que envolvem várias vias enzimáticas). Posteriormente, a testosterona (T) é transportada às células foliculares, na qual é aromatizada a  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) pela enzima aromatase, também sob influência do FSH. O  $E_2$  age no fígado (via corrente sanguínea), estimulando a síntese da glicolipofosfoproteína (vitelogenina) que, também via corrente sanguínea, é “sequestrada” pelo oócito por micropinocitose (processo dependente de FSH), promovendo o crescimento do oócito e incorporação de vitelo.

Assim, na fase de vitelogenese, que é um processo pelo qual o citoplasma do oócito acumula substâncias de reservas para posterior utilização pela larva, ocorre um aumento nos níveis plasmáticos de  $E_2$  e T e esse aumento inibe a síntese de FSH (*feedback* negativo) e juntamente com a ação do GnRH estimulam a secreção do LH nas fases finais da vitelogenese. O LH estimula às células da teca do folículo ovariano a produzir  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona ( $17\alpha$ -OHP), que é transportada às células foliculares e convertida a  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihidroxy-4-pregnen-3-one ( $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DHP) ou  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -21-trihidroxy-4-pregnen-3-one ( $17\alpha$ ,  $20\beta$ -21-DHP) pela enzima  $20\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogenase ( $20\beta$ -HSD), dependendo da espécie considerada (Nagahama, 1997; Peter & Yu, 1997; Nagahama & Yamashita, 2008; Lubzens et al., 2010). O hormônio  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DHP é conhecido como o hormônio indutor da maturação final e da ovulação (do inglês: *Maturation-Inducing Steroid*, MIS) na maioria dos peixes. A figura 04 apresenta um resumo esquemático da via esteroidogênica, indicando os principais esteróides (estrógenos ou  $C_{18}$ , andrógenos ou  $C_{19}$ , progestágenos ou  $C_{21}$ ) e enzimas

envolvidas durante a maturação oocitária, vitelogênese e maturação final, nas camadas foliculares dos oócitos, em resposta a cada tipo de GtHs (FSH ou LH).

Além do mais, como demonstrado anteriormente, há uma permanente comunicação entre o complexo eixo hipotálamo-hipófise com os órgãos periféricos (particularmente as gônadas), permitindo assim, a sincronização de todos os passos do ciclo de vida (Fig. 3). Neste caso, de particular importância na comunicação entre o eixo hipotálamo-hipófise com as gônadas, são os esteróides sexuais (andrógenos, progestágenos e estrógenos), pois são indicadores do *status* sexual de qualquer vertebrado (Zohar et al., 2010). Estes esteróides gonadais podem atuar em vários tecidos (como por exemplo: fígado, hipófise, encéfalo e na própria gônada), 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 (Munakata & Kobayashi, 2010). 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 decifrados (Zohar et al., 2010).

Neuromoduladores do processo reprodutivo podem estimular e/ou inibir este processo, atuando principalmente no hipotálamo e secundariamente na hipófise (Zohar et al., 2010). Um dos candidatos à inibição da liberação de GtHs em várias espécies de peixes (mas não em todas) é a dopamina (Dufour et al., 2005). Este pequeno neurotransmissor pode interagir com receptores de dopamina presentes nos neurônios produtores de GnRH, diminuindo a estimulação de GtHs através do GnRH e/ou diretamente na hipófise, como demonstrado em *Carassius auratus*, espécie na qual foi evidenciado que as GtHs apresentam receptores dopaminérgicos (Dufour et al., 2005; Zohar et al., 2010). Adicionalmente, foi identificado mais recentemente em aves e posteriormente em peixes, outro neuro-hormônio com ação inibitória na síntese e liberação de GtHs, denominado de hormônio inibidor de gonadotropinas (GnIH) (Tsutsui et al., 2007; Tsutsui & Osugi, 2009; Zohar et al., 2010). O GnIH atua diretamente na hipófise, no entanto, pode exercer uma ação modulatória nos neurônios de GnRH, pois foram observadas fibras de GnIH emitidas na direção de neurônios de GnRH (Zohar et al., 2010). Além disso, a síntese de GnIH é modulada por fatores ambientais, principalmente pelo fotoperíodo (influência dos fatores ambientais no eixo reprodutivo será apresentado a seguir), sugerindo também o papel deste neuromodulador na transdução de sinais externos para os centros endócrinos envolvidos no controle da reprodução.

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor que provavelmente inibe a ação da dopamina e estimula a síntese/liberação de GnRH e também na síntese/liberação de LH (Trudeau et al., 1993; Zohar et al., 2010). No entanto, a síntese e liberação de GABA, possivelmente são dependentes dos níveis dos esteróides gonadais, e conseqüentemente do estágio do ciclo reprodutivo do animal (Zohar et al., 2010). Além deste neurotransmissor que atua estimulando a síntese e liberação de LH e GnRH, outro fator que interage de maneira dose-dependente com o estágio e período do ciclo reprodutivo, com o GnRH, com as GtHs e com os níveis circulantes de esteróides gonadais, é o IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina), sugerindo também que o IGF-1 está envolvido com o desenvolvimento gonadal e elevação da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Onuma et al., 2009; Reinecke, 2010).

Outro neuromodulador com foco em fisiologia de peixes relacionado com a reprodução é o neuropeptídeo Y (NPY). Apesar de o NPY estar diretamente relacionado com a regulação da alimentação, este mesmo neuropeptídeo está envolvido com a modulação de GtHs, e também na liberação de GnRH e, portanto, o NPY está relacionado com o crescimento, com a alimentação e com o eixo reprodutivo. Neste contexto, muitas espécies de peixes, reduzem o consumo de alimento durante o período reprodutivo (Mazumdar et al., 2007; Zohar et al., 2010). Adicionalmente, os esteróides sexuais (especificamente o E<sub>2</sub> e a T) estimulam a expressão de mRNA em neurônios da área pré-óptica que codificam o NPY em *C. auratus*, indicando desta forma, um efeito de *feedback* positivo dos esteróides sexuais em regiões específicas do encéfalo, além dos efeitos diretos sobre a hipófise (Trudeau, 1997). Em peixes teleósteos, estes são alguns neuromoduladores do ciclo reprodutivo, no entanto, há outros fatores, como a leptina (Blüher & Mantzoros, 2007), os corticosteróides (Milla et al., 2009), hormônio anti-Mülleriano (AMH) e também outros fatores de crescimento (*i.e.*, IGF-3) (Nóbrega, 2011), interagindo com o sistema endócrino e modulando também a reprodução, não obstante há um déficit de dados sobre estes alvos.

No que diz respeito à influência dos fatores ambientais neste eixo (Fig. 3), o papel do fotoperíodo na influência sazonal do ciclo reprodutivo em peixes teleósteos é bem estabelecido na literatura, entretanto, os mecanismos fisiológicos envolvidos nesta modulação ainda não são bem compreendidos. Em várias espécies de teleósteos, foram registrados que os sinais de fotoperíodo são capazes de modificar o comportamento e o sistema reprodutivo, principalmente alterando a sensibilidade dos neurônios de GnRH, que são os neurônios do sistema nervoso central que controlam o comportamento e a fisiologia reprodutiva em todos os vertebrados como apresentado anteriormente (Fiszbein et al., 2010). Todavia, os resultados

de estudos da influência do fotoperíodo em peixes apresentaram efeitos positivos, negativos e nenhum efeito deste fator sobre a maturação gonadal (Falcón et al., 2007, 2010). Por outro lado, sabe-se também, que a glândula pineal, é um dos componentes centrais do sistema circadiano, que é influenciado pelo ciclo de claro e escuro ambiental, e que está principalmente relacionado com o controle do ritmo circadiano e circunual em todos os grupos de vertebrados (Falcón et al., 2007, 2010). Este órgão é responsável pela secreção da melatonina (*N-acetyl-5-methoxytryptamine*), sendo que, esta produção é realizada exclusivamente durante a fase escura do dia e acredita-se que este hormônio seja um dos principais responsáveis pelos efeitos do fotoperíodo sobre o sistema endócrino, agindo em diferentes níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e, portanto, fornecendo informações cruciais sobre a sinalização ambiental e controle endócrino, especialmente na atividade reprodutiva (Kah et al., 1999; Falcón et al., 2007, 2010).

Adicionalmente, em 2003, foi descoberto mais um componente do sistema neuroendócrino que possui íntima relação com a regulação da reprodução e da puberdade em vertebrados, o chamado sistema *kisspeptina* e seu receptor *kiss1r* (denominado antigamente de *Gpr54*) (Taranger et al., 2010; Zohar et al., 2010). Os neurônios produtores de *kisspeptina* foram encontrados principalmente na região do telencéfalo e bulbo olfatório, mesma região que se localizam os neurônios de GnRH (Akazome et al., 2010; Migaud et al., 2010). Além desta mesma localização, o receptor *kiss1r* está presente em neurônios produtores de GnRH, indicando fortemente a influência deste sistema sobre o eixo reprodutivo (Zohar et al., 2010). Enquanto isso sabe-se também, que a melatonina está relacionada com a modulação da síntese e liberação de *kisspeptina* e, portanto, dar-se a entender, que o fator fotoperíodo modula o eixo reprodutivo em diferentes níveis. Este preciso *link* entre as mensagens do fotoperíodo (principalmente em relação à neuromodulação da melatonina), e os efeitos sobre o sistema neuroendócrino em peixes, precisam ser investigados mais profundamente em teleostes.

Outro fator ambiental com influência na reprodução é a temperatura (Fig. 3), pois pequenas mudanças na temperatura podem causar alterações no ciclo reprodutivo, na síntese hormonal, gametogênese, aptidão reprodutiva, entre outras características (Ospina-Álvarez & Piferrer, 2008; Blázquez & Somoza, 2010). Além disso, uma das ações diretas da temperatura na fisiologia dos animais é a modulação na determinação do sexo, conhecida como “sexo dependente de temperatura” (TSD), relatada primeiramente em répteis, grupo em que este processo é conhecido (Lance, 2009). Nos peixes, alguns autores sugerem que várias espécies apresentam o fenômeno de TSD, que pode ser considerado como indicador seguro de impactos biológicos relacionados ao aquecimento global, desde que, as mudanças na

proporção sexual, induzida pela temperatura, constituem uma resposta direta relacionada com as flutuações térmicas ambientais (Blázquez & Somoza, 2010). Entretanto, os mecanismos fisiológicos envolvidos neste fenômeno (TSD) ainda não são bem compreendidos.

Elevações na vazão dos rios em regiões neotropicais decorrentes do período de chuvas (aumento da pluviosidade) resultam em pouca alteração sazonal na temperatura da água (Lucas & Baras, 2001). No entanto, este aumento na vazão dos rios neotropicais durante este período, induz a grandes alterações neste ecossistema, como por exemplo, disponibilidade de ambiente favorável, nível de água, corrente, transparência, condutividade, oxigênio dissolvido, entre outros parâmetros e, portanto, torna-se difícil de determinar qual (is) deste (s) fator (es) é (são) o (s) que prevalece (m) na influência da pluviosidade no eixo reprodutivo. Adicionalmente, em muitos casos, o aumento da pluviosidade e conseqüentemente a vazão dos rios, definem os padrões migratórios das espécies de peixes, influenciando principalmente as espécies reofílicas neotropicais (Lucas & Baras, 2001). Não obstante, para as espécies neotropicais, estes fatores ambientais apresentados acima, são claramente os sinais ambientais que mais alteram o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas em peixes, no entanto, outros fatores, como por exemplo: qualidade da água, disponibilidade de alimento, entre outros fatores participam também desta modulação do ciclo reprodutivo (Lucas & Baras, 2001; Trudeau, 2006), demonstrando assim grande importância dos fatores externos na modulação do ciclo reprodutivo em peixes teleósteos.

De uma forma em geral, sabe-se que todo esse controle ocorre quando os peixes encontram-se no ambiente natural, mas altera-se de alguma forma, ainda pouco esclarecida, quando espécies reofílicas migradoras são transferidas para o cativeiro, em operações de cultivo (produção animal) e/ou na conservação de espécies em extinção (piscicultura de conservação), pois, neste ambiente confinado, os peixes migradores não conseguem eliminar os seus gametas de forma natural. Neste caso, intervenções hormonais exógenas em diferentes níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Fig. 3) são necessárias para dar continuidade ao processo de maturação gonadal (Mylonas et al., 2010), procedimento necessário para a maioria das espécies ícticas neotropicais, por serem reofílicas migradoras. O entendimento do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas nas espécies migradoras neotropicais foi pouco compreendido até o momento, devido principalmente ao grande número de espécies que apresentam esta disfunção endócrina em cativeiro, além do mais, pouco investimento de estudos neste tema é realizado atualmente. Esse fato é ainda mais preocupante quando considera-se uma espécie ameaçada de extinção, como a proposta neste trabalho (breve descrição do modelo biológico, anexo 1), haja vista de que o sucesso reprodutivo é a premissa



básica para o restabelecimento de uma espécie (Pough et al., 2003), e para um futuro trabalho de repovoamento e/ou conservação.

Duas das maiores ameaças a ictiofauna neotropical, é a construção de barragens nos rios e os níveis elevados de degradação ambiental, que é particularmente muito severo na Bacia do Rio Paraíba do Sul (Caneppele et al., 2008). Adicionalmente, deve-se destacar que esta Bacia merece especial atenção devido à ação antrópica causada pela instalação da Companhia Siderúrgica Nacional de Volta Redonda (RJ). Este impacto é destacado como um dos principais fatores que levaram algumas espécies endêmicas, como *Steindachneridion parahybae* (Honji et al., 2009) e *Brycon insignis* (Brasil, 2004), à Lista de Espécies Ameaçadas. Além do mais, um desastre ecológico ocorreu no ano de 2008 (CRBio2, 2009), no qual, foi constatado o despejo de 8 mil litros de um poderoso pesticida (endossulfan), o que contaminou grande parte do Rio Pirapetinga, que deságua no rio Paraíba do Sul e conseqüentemente a mortalidade de fração importante da ictiofauna local. Este fato contribui para uma ação urgente de conhecimento da biologia reprodutiva de espécies ameaçadas, para que, principalmente no caso de *S. parahybae* e *B. insignis* não corram o risco de extinção. Por fim, para melhor compreensão dos objetivos do presente estudo, a seguir, serão descritos os principais hormônios neuroendócrinos responsáveis pelo controle endógeno da reprodução em peixes teleósteos.

### 1.3. Hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH)

O GnRH é um neuropeptídeo sintetizado no hipotálamo, representando um dos primeiros passos na cascata de hormônios que coordena os processos fisiológicos reprodutivos em todos os vertebrados (Weltzien et al., 2004; Guilgur et al., 2006; Zohar et al., 2010). Como apresentado anteriormente, este neuropeptídeo em teleósteos é liberado na hipófise, via inervação direta nas células gonadotrópicas, que por sua vez, estimula a síntese e liberação das GtHs hipofisárias, que estimulam a esteroidogênese e o desenvolvimento gonadal (Fig. 3), ou seja, o GnRH é um dos *links* essenciais na integração dos estímulos externos e internos que controlam a reprodução em todos os vertebrados (Dubois et al., 2002; Lethimonier et al., 2004; Guilgur et al., 2006). É importante salientar, que muitos dos avanços na compreensão do sistema de GnRH em mamíferos tem a sua origem em pesquisas realizadas em peixes teleósteos (Guilgur, 2008).

Atualmente, sabe-se que a maioria das espécies de vertebrados possuem mais de uma forma molecular de GnRH (Weltzien et al., 2004; Zohar et al., 2010), no entanto, em um único animal, a presença de múltiplas formas deste neuropeptídeo, originou um dos maiores

problemas para o entendimento fisiológico do papel das diferentes formas de GnRH na reprodução de uma única espécie. Além disso, este problema ainda é mais complexo, quando foram identificadas 3 diferentes formas no encéfalo de peixes teleósteos (González-Martínez et al., 2001, 2002, 2004; Servili et al., 2010; Zohar et al., 2010).

Segundo Sherwood & Adams (2005), Guilgur et al. (2006), Kah et al. (2007) e Zhang et al. (2008), são caracterizadas 25 diferentes formas moleculares de GnRH em várias espécies de vertebrados e invertebrados (14 formas em vertebrados e 11 formas em invertebrados), entretanto, todas estas diferentes formas moleculares são decapeptídeos, exceto em *Octopus vulgaris* (Iwakoshi et al., 2002) e *Aplysia californica* (Zhang et al., 2008), que possuem doze aminoácidos. Adicionalmente, os aminoácidos número 01, 04, 09 e 10 são perfeitamente conservados ao longo da evolução (Tabela 1). Além disso, tradicionalmente, as diferentes formas de GnRH são comumente conhecidas pelo nome da espécie em que foi primeiramente isolada (Weltzien et al., 2004; Guilgur et al., 2006; Tsai, 2006), no entanto, diferentes nomenclaturas têm sido propostas, o que será discutido posteriormente (Muske, 1997; Fernald & White, 1999; Dubois et al., 2002).

Com esta diversidade de diferentes formas moleculares de GnRH somado com a maioria das espécies expressando mais de uma forma de GnRH (Fig. 5), a presença de variantes moleculares de GnRH no encéfalo de cada grupo de vertebrados têm sido identificadas: mamíferos (White et al., 1998), aves (Stevenson et al., 2007), répteis (Lovejoy et al., 1991a), anfíbios (Conlon et al., 1993), peixes teleósteos (Sherwood & Adams, 2005), elasmobrânquios (Lovejoy et al., 1991b), e em peixes não mandibulados (agnatas) (Sower et al., 1993, 2009). Atualmente, pode-se afirmar que todas as espécies de vertebrados expressam 2 ou 3 formas moleculares distintas de GnRH (Sherwood & Adams, 2005; Guilgur et al., 2006; Zohar et al., 2010). Com a exceção das lampréias, em que foram identificadas apenas duas formas de GnRH (*lamprey*-GnRH-I e *lamprey*-GnRH-II), todas as outras espécies de vertebrados apresentam um padrão característico, no qual, a forma molecular *chicken* GnRH-II (cGnRH-II), foi detectada no encéfalo (mais especificamente no cérebro médio), e uma ou duas formas na porção mais ventral do encéfalo, especialmente na área pré-óptica e no hipotálamo, além de estar presente na hipófise (Sherwood & Adams, 2005; Guilgur et al., 2006; Kavanaugh et al., 2008; Zohar et al., 2010). Assim sendo, cGnRH-II é a forma mais conservada e presente em todos os vertebrados mandibulados (*Gnathostomata*), incluindo os mamíferos (inclusive também no homem, White et al., 1998).

Desta forma, nos vertebrados que expressam duas formas moleculares de GnRH, o cGnRH-II é a segunda forma (sempre identificada no cérebro médio), e uma primeira forma,

“específica da espécie”, localizada na região mais ventral do encéfalo (Sherwood & Adams, 2005; Guilgur et al., 2006; Kah et al., 2007; Zohar et al., 2010). A maioria dos mamíferos, anfíbios e peixes não *Actinopterygii* e *Actinopterygii* mais basais (Chondrostei, Polypteriformes e Lepisosteiformes) apresentam o *mammalian*-GnRH (mGnRH). Por outro lado, algumas espécies de anfíbios e em alguns teleósteos considerados mais basais, não apresentam o mGnRH, como por exemplo, o anfíbio *Rana dybowskii* que expressa o *rana*-GnRH (rGnRH) (Yoo et al., 2000), e em salmões (*Oncorhynchus* spp.) e em *C. auratus*, que apresentam o *salmon*-GnRH (sGnRH) (Kobayashi et al., 1997). Adicionalmente, em Siluriformes (Ostariophysi), foram identificados apenas o cfGnRH (*catfish*), além da forma conservada de GnRH (cGnRH-II) (Bogerd et al., 1994; Zandbergen et al., 1995; Dubois et al., 2002). Em aves, foram identificados o cGnRH-II (forma conservada) e o cGnRH-I (*chicken*-GnRH-I), assim como em répteis (expressam cGnRH-I e cGnRH-II) (Tsai & Licht, 1993; Millam et al., 1998).

Para os *Actinopterygii*, considerados mais derivados, a grande maioria das espécies apresentam 3 distintas formas moleculares de GnRH, sendo expresso sempre o cGnRH-II e o sGnRH, além de, uma terceira forma que pode ser considerada específica (Weltzien et al., 2004; Guilgur et al., 2006; Zohar et al., 2010). Em geral para Characiformes (Characidae) a terceira forma de GnRH encontrada foi o sbGnRH (*seabream*) (Powell et al., 1997), para Cyprinodontiformes (Atherinopsidae) o pjGnRH (*pejerrey*) (Montaner et al., 2001), para Perciformes (Cichlidae) o sbGnRH (Pandolfi et al., 2005), entre outras formas (Fig. 5) (Lethimonier et al., 2004; Sherwood & Adams, 2005; Guilgur et al., 2006; Kah et al., 2007). A presença destas diferentes formas de GnRH identificadas em várias espécies de teleósteos levanta a questão sobre a precisa função das múltiplas formas de GnRH no controle da reprodução e de outros processos fisiológicos, como por exemplo, no comportamento reprodutivo.

Ainda em relação às diferentes formas de GnRH em peixes teleósteos, os neurônios sintetizadores deste hormônio apresentam distribuição neuro-anatômica diferenciada, como por exemplo, o sGnRH é expresso por neurônios do gânglio nervoso terminal, principalmente na junção dos bulbos olfatórios com o telencéfalo ventral, o cGnRH-II expresso pelos neurônios localizados no tegumento do mesencéfalo (anterior, o “*midbrain*” ou cérebro médio) e na região posterior do diencéfalo (o sinencéfalo), e a terceira forma que é expressa principalmente pelos neurônios pré-ópticos (telencéfalo ventral mais posterior), hipotálamo basal e glândula hipofisária (para revisão veja: Guilgur et al., 2006; Zohar et al., 2010). Com isto, as diferentes formas de GnRH são identificadas em diferentes regiões do encéfalo

(Dubois et al., 2002; González-Martínez et al., 2004; Pandolfi et al., 2005), e as diferentes funções destas diversas formas de GnRHs encontradas em diferentes regiões, ainda são discutidas na literatura especializada. Sugere-se que o cGnRH-II atue como um neuromodulador e/ou possui um papel fundamental no comportamento reprodutivo. Já a segunda ou terceira forma, está relacionada especificamente com a reprodução, ou seja, sugere-se que esteja relacionada com a liberação das GtHs na hipófise dependendo da espécie a ser considerada (Dubois et al., 2002; Sherwood & Adams, 2005; Pandolfi et al., 2005).

Em peixes teleósteos não é observado um sistema porta hipotálamo-hipofisário (como bem caracterizado em vertebrados tetrápodos), com isso, as fibras nervosas de GnRH terminam próximas às células gonadotrópicas na hipófise e como consequência, os GnRHs estão presentes nos extratos de encéfalo e da hipófise. Entretanto, em vários peixes teleósteos, pelo menos uma das formas moleculares de GnRH encontrada no encéfalo não foi detectável na hipófise, levantando-se outra questão a respeito de qual (ou quais) formas estão presentes na hipófise e qual (is) estimula (m) a produção de GtHs na hipófise (Powell et al., 1994; Somoza et al., 1994; Goos et al., 1997). Neste sentido, alguns estudos apontam que, apenas o cGnRH-II foi identificado no encéfalo e não foi observado na hipófise (é importante lembrar que o cGnRH-II é identificado em todas as espécies de teleósteos) e com isso, a distribuição diferencial das diferentes formas de GnRHs sugerem diferentes funções para estes diferentes peptídeos (Goos et al., 1997). Neste contexto, a identificação exata das diferentes formas moleculares de GnRH e a sua distribuição é de suma importância para entender os primeiros passos no controle da reprodução de peixes teleósteos.

Adicionalmente, como apresentado anteriormente, o GnRH é um neuropeptídeo hipotalâmico que é composto por poucos aminoácidos (10 aminoácidos no total), e com isso os anticorpos para GnRH apesar de serem mais ou menos específicos, apresentam reações cruzadas entre as diferentes formas de GnRH dependendo da espécie em questão. Em várias espécies de peixes teleósteos estudados, foi observado que os cDNAs que codificam os GnRHs apresentam peptídeos associados ao GnRH (os chamados – GAP), estes GAP conferem maior especificidade do que os próprios GnRHs por serem oligopeptídeos maiores do que os GnRHs (Fig. 6). Além do mais, estes GAPs são produzidos a partir de moléculas precursoras de GnRH e estão co-localizados dentro das células que expressam o GnRH (Dubois et al., 2001; González-Martínez et al., 2001, 2002, 2004; Pandolfi et al., 2005).

A característica mais importante destes peptídeos, é que os diferentes GAPs estão associados a diferentes GnRHs, assim, os diferentes anticorpos para GAP podem ser utilizados para reações de imuno-histoquímicas como para hibridização *in situ* (Pandolfi et al.,

2005), assim, podem ser utilizados para identificar as diferentes formas de GnRH (Pandolfi et al., 2005). González-Martínez et al. (2002) demonstraram que em *seabass* (*Dicentrarchus labrax*), os peptídeos de GnRH e GAP são co-expressos na mesma célula e confirmam que o anticorpo para GAP representa uma ferramenta valiosa para localizar especificamente as células que expressam as diferentes formas de GnRH, evitando o problema da reação cruzada, que eventualmente ocorre quando se utiliza os anticorpos para GnRH. Além do mais, a função fisiológica dos diferentes GAPs ainda não é completamente conhecida, no entanto, foi demonstrado em ratos, que o GAP é necessário para o funcionamento correto do GnRH (Seeburg et al., 1987).

No que diz respeito às espécies da ordem Siluriformes, apenas, *Clarias gariepinus* (*catfish* africano), *Ictalurus punctatus* (*catfish* americano), e *C. macrocephalus* (*thai catfish*), são as espécies mais estudadas em relação à fisiologia da reprodução (Ngamvongchon et al., 1992; Dubois et al., 2001; Ballenger, 2007). Todas estas espécies são exóticas e nenhuma espécie neotropical foi estudada sob este aspecto até o momento. As espécies da ordem Siluriformes são bons modelos biológicos por apresentarem diferenças dentro deste grupo de peixes teleósteos em relação aos demais grupos, como por exemplo, em *C. gariepinus*, apenas duas formas de GnRH foram identificadas, como mencionado anteriormente (cGnRH-II e cfGnRH) (Zandbergen et al., 1995; Dubois et al., 2001), além de apresentarem muitas dificuldades na caracterização de FSH e LH, assim sendo, não estão claramente identificadas as GtHs neste grupo de peixes teleósteos (Koide et al., 1992; Schulz et al., 1995; Agulleiro et al., 2006). Ainda em relação às diferenças observadas neste grupo, em extratos de hipófise (Schulz et al., 1993) e de encéfalo (Bogerd et al., 1992) de *C. gariepinus*, foram identificadas estas duas formas de GnRH, entretanto, não necessariamente as duas formas de GnRH são liberadas na hipófise e controlam a síntese e liberação de GtHs.

Do mesmo modo, em estudos pioneiros com *C. gariepinus*, segundo Schulz et al. (1993), aparentemente, duas formas de GnRH (cGnRH-II e cfGnRH) foram identificadas na hipófise, levantando a questão de como estas duas formas de GnRH em bagres estão envolvidas com a liberação de GtHs? Esta pergunta foi pertinente, pois, em experimentos *in vitro* e *in vivo*, ambas as formas de GnRHs estimularam a liberação de GtHs (Goos et al., 1997). Neste sentido, se reveste de suma importância os estudos sobre as diferentes formas de GnRHs e das GtHs em peixes teleósteos. Como foram observadas as duas formas de GnRH em extratos de encéfalo e de hipófise de bagres (cfGnRH e cGnRH-II), outras análises foram realizadas para verificar as possíveis funções dos diferentes GnRH na fisiologia dos Siluriformes. Neste caso, estudos com imuno-histoquímica (anti-GAP) e hibridização *in situ*

mostraram que apenas os neurônios de cfGnRH projetam os axônios para a região da hipófise, e que o cGnRH-II está limitado ao tegumento do cérebro médio, e que apenas poucos neurônios de cGnRH-II são observados ao longo do terceiro ventrículo, assim sendo, não são observadas fibras desta forma molecular de GnRH na hipófise (Goos et al., 1997). Por conseguinte, a co-localização de GnRHs (cfGnRH e cGnRH-II) encontrada em bagres em estudos anteriores (Schulz et al., 1993), utilizando anticorpos para GnRH, provavelmente pode ser reflexo de uma reação cruzada do cGnRH-II com a alta concentração de cfGnRH. Assim sendo, ainda não é bem compreendido o eixo hipotálamo-hipófise em Siluriformes.

Diante do que foi exposto sobre a diversidade de GnRHs, algumas considerações evolutivas a respeito dos vertebrados que apresentam 2 ou 3 formas de GnRH, também podem ser sugeridas (Montaner et al., 2002; Somoza et al., 2002a, b; Pandolfi, 2005; Okubo & Nagahama, 2008). Seguindo o cladograma dos *Actinopterygii* apresentado por Nelson (1994), *Clupea harengus* (Clupeiformes), é considerado um teleósteo basal e foram identificadas 3 formas de GnRH nesta espécie, o cGnRH-II, o sGnRH e a terceira forma específica, o hrGnRH (*herring*-GnRH) (Carolsfeld et al., 2000); nas espécies de salmões (Protacanthopterygii), que também pode ser considerado um grupo basal, no entanto, os Salmoniformes, que aparentemente evoluíram depois dos Clupeiformes, foram identificadas apenas 2 formas de GnRH (cGnRH-II e sGnRH) (Kobayashi et al., 1997). *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) e *C. gariepinus* (Pimelodidae), ambos Ostariophysii, considerado um grupo entre os Clupeiformes e Protacanthopterygii, expressam respectivamente 3 formas de GnRH (cGnRH-II, sGnRH e sbGnRH em *P. mesopotamicus*) (Powell et al., 1997) e 2 formas de GnRH (cGnRH-II e cfGnRH em *C. gariepinus*) (Zandbergen et al., 1995) e, portanto, os *Actinopterygii* provavelmente as espécies que apresentam 2 ou 3 formas de GnRH (dependendo da espécie a ser considerada); neste caso, indicam 3 possibilidades evolutivas: 1) a terceira forma de GnRH pode ter sido perdida durante a evolução dos Salmoniformes e em alguns grupos dentro dos Ostariophysii; 2) os Salmoniformes e os grupos dentro dos Ostariophysii que apresentam duas formas de GnRH (*i.e.*, Siluriformes) possuem uma terceira forma ainda não identificada; 3) a presença de 3 formas de GnRH possa ter surgido de 3 linhagens diferentes (Clupeiformes, Ostariophysii e Acanthopterygii). Além disso, estudos recentes apontam que a presença de 3 formas moleculares de GnRH não é um caráter exclusivo de peixes teleósteos, ou seja, em porquinho-da-Índia, *Cavia aperea* e em capivaras, *Hydrochaerus hydrochaerus*, ambos mamíferos, expressam 3 formas moleculares de GnRH, o cGnRH-II, mGnRH e *guinea-pig*-GnRH (gpGnRH), portanto, sugere-se que provavelmente todas as espécies de vertebrados que

apresentam apenas 2 formas diferentes de GnRH, apresentam uma terceira variante ainda não identificada (Montaner et al., 2002; Pandolfi, 2005).

### 1.3.1. Acerca da nomenclatura das diferentes formas moleculares de GnRH

Tradicionalmente, se aceita que os peptídeos das diferentes formas de GnRH recebam o nome da espécie em que foram primeiramente isolados (Weltzien et al., 2004; Guilgur et al., 2006; Tsai, 2006), no entanto, diferentes nomenclaturas têm sido propostas, e que apresentam suas vantagens e desvantagens (Muske, 1997; Fernald & White, 1999; Dubois et al., 2002).

A nomenclatura tradicional, apesar de ser utilizada com mais frequência, também apresenta as suas desvantagens, pois, dois grupos distintos de pesquisadores demonstraram em diferentes espécies a mesma sequência de GnRH, o *medaka*-GnRH (mdGnRH), por sequenciamento do cDNA (Okubo et al., 2000), e o pjGnRH, por isolamento e sequenciamento do peptídeo maduro (Montaner et al., 2001). Neste caso, as duas espécies distintas apresentam a mesma sequência de GnRH (pGLU-His-Trp-Ser-Phe-Gly-Leu-Ser-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>), entretanto, a mesma forma molecular recebeu dois nomes distintos (mdGnRH e pjGnRH).

Miyamoto et al. (1983) também sugerem outra nomenclatura com base em informações da estrutura primária da molécula, e tem sido aplicada desde as primeiras variantes moleculares. Esta nomenclatura utiliza como padrão o mGnRH, que é referido como GnRH, e as outras variantes, são nomeadas de acordo com os aminoácidos que se diferenciam do mGnRH, ou seja, para o cGnRH-II seria [His<sup>5</sup>-Trp<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>]GnRH; para o gpGnRH seria conhecido como [Tyr<sup>2</sup>-Val<sup>7</sup>]GnRH, entre outros (Tabela 01).

Muske (1997) propõe a existência de 2 sistemas neuronais de GnRH, com base em critérios embriológicos e funcionais, ou seja, o sistema do cérebro-anterior ou sistema do nervo-terminal-septo-pré-óptico, e o sistema do cérebro médio ou sistema cGnRH-II. Neste caso, este autor não considera as diferentes formas moleculares identificadas na região ventral do encéfalo (nas espécies que apresentam 3 formas, sendo 2 delas, na região ventral do encéfalo). Além dessa nomenclatura de Muske (1997), Dubois et al. (2002), com base na localização anatômica e funcional, sugeriram a seguinte nomenclatura: MBGnRH (*midbrain* GnRH), correspondente ao cGnRH-II; VFGnRH (*ventral forebrain* GnRH), a variante com função hipofisiotrófica, ou seja, com função fisiológica na liberação de GtHs; e a TNGnRH (*terminal-nerve* GnRH), correspondente a variante que se localiza no nervo terminal, que neste caso, seria o sGnRH para as espécies que apresentam 3 formas moleculares de GnRH. Entretanto, como esta nomenclatura se aplicaria em uma espécie que apresenta apenas 2

formas de GnRH? A variante hipofisiotrópica (VFGnRH) e a variante TNGnRH (nervo terminal), com a mesma forma molecular, receberiam dois nomes diferentes?

Fernald & White (1999) propuseram a nomenclatura que segue, com base em análises filogenéticas e os sítios de expressão dos GnRHs. Neste caso, o GnRH-1, refere-se a forma de GnRH encontrada na região do hipotálamo e ligada à função reprodutiva; o GnRH-2, correspondente ao cGnRH-II identificada na região do cérebro médio, e provavelmente este GnRH interage com a glândula pineal, modulando a síntese/liberação de melatonina (recentemente proposta por Servili et al., 2010); e o GnRH-3, presente no nervo terminal e que está relacionado com a função neuromodulação e comportamento reprodutivo. Todavia, esta nomenclatura também apresenta o mesmo problema da terminologia proposta por Dubois et al. (2002).

Durante o desenvolvimento desta tese, a nomenclatura tradicional, ou seja, seguindo o nome da espécie em que foi primeiramente isolada será utilizada, no entanto, em alguns casos a terminologia de Fernald & White (1999) poderá ser aplicada.

### *1.3.2. Origem embriológica das diferentes formas moleculares de GnRH*

Devido a importância do sistema de GnRH na reprodução dos vertebrados, a origem e o desenvolvimento embriológico deste sistema ainda é um dos principais pontos de interesse em pesquisas. Geralmente é aceito que os neurônios de GnRH localizados no encéfalo ventral, incluindo os neurônios dos bulbos olfatórios, telencéfalo ventral (GnRH-3), área pré-óptica e hipotálamo ventral (GnRH-1), originam-se durante o desenvolvimento embriológico do placóide olfatório em muitas espécies de vertebrados, ou seja, estes neurônios surgem do placóide olfatório e migram para o encéfalo ventral durante os primeiros dias de desenvolvimento (Schwanzel-Fukuda & Pfaff, 1990). Adicionalmente, uma falha nesta migração dos neurônios de GnRH durante o desenvolvimento embrionário, resultam em uma falha na maturação gonadal, deficiência na secreção de GtHs, e conseqüentemente no processo reprodutivo (Okubo et al., 2006). Em seres humanos, a síndrome de Kallman (*X-linked Kallmann syndrome*), é uma desordem caracterizada pela ausência das funções gonadais e do sistema olfatório, sendo sugerido que esta síndrome é causada pela incapacidade dos neurônios de GnRH migrarem da região olfatória para as principais regiões ventrais do telencéfalo e diencéfalo (MacColl et al., 2002; Okubo et al., 2006; Whitlock et al., 2006).

O GnRH-2, localizado na região do cérebro médio, tem origem diferente do GnRH-1 e GnRH-3, que originam-se da zona epêndima ventricular e/ou região germinal próximo ao



terceiro ventrículo (Dubois et al., 2001; González-Martínez et al., 2002; Pandolfi et al., 2002). Não obstante, a precisa origem destes neurônios de GnRH-2 na região do cérebro médio continua incerta.

Ainda em relação às diferentes origens embriológicas do sistema de GnRH em peixes teleósteos, o surgimento dos neurônios de GnRH durante a ontogênese neste sistema é distinto (Dubois et al., 2001; González-Martínez et al., 2002; Pandolfi et al., 2002). Para *D. labrax* (Perciformes), espécie que apresenta 3 diferentes formas moleculares de GnRH, a primeira variante expressa durante o desenvolvimento é o GnRH-2, sendo identificada no 4º dia após a eclosão, seguida pelo GnRH-3, sendo detectado no 7º dia após a eclosão, e por último, o GnRH-1, sendo expresso no 30º dia após a eclosão (González-Martínez et al., 2002). Dentro desta mesma ordem, para *Cichlasoma dimerus*, que também apresenta 3 formas de GnRH, o surgimento dos neurônios de GnRH foi distinto de *D. labrax*, sendo expresso o GnRH-3 (3º dia após a fertilização), o GnRH-2 (5-6º dia após a fertilização) e o GnRH-1 (22-30º dia após a fertilização) (Pandolfi et al., 2002). Esta sequência de surgimento para GnRH em *C. dimerus*, também foi semelhante ao identificado para *Pagrus major* (GnRH-3: 1-5º dia após a eclosão; GnRH-2: 6º dia após a eclosão; e GnRH-1: 35º dia após a eclosão) (Ookura et al., 1999).

Para *C. gariiepinus* (Siluriformes), espécie que apresenta apenas 2 diferentes formas de GnRH, a população de neurônios de cGnRH-II surgiu na segunda semana após eclosão, assim como os neurônios e fibras de cfGnRH, que surgiram respectivamente na região ventral do telencéfalo e na hipófise na mesma segunda semana, e posteriormente na área pré-óptica e hipotálamo ventral (entre a 4-6 semana) (Dubois et al., 2001). Em *O. nerka* e *O. keta*, ambos Salmoniformes, e que também apresentam apenas cGnRH-II e sGnRH, sendo esta última forma responsável pela reprodução nestas espécies, foram identificadas respectivamente no 16º e 19º dia após a fertilização (Chiba et al., 1994; Parhar et al., 1995).

A importância do sistema de GnRH no início do desenvolvimento embrionário foi apresentada acima, e anteriormente no controle neuroendócrino da reprodução em peixes teleósteos adultos, entretanto, para a aquicultura comercial e/ou piscicultura de conservação, este sistema também é de grande importância no controle neuroendócrino da puberdade, principalmente em relação à ativação (ou reativação) dos neurônios de GnRH hipofisotrópico (Taranger et al., 2010). Por conseguinte, a competência reprodutiva é adquirida durante a puberdade, e envolve o sistema de GnRH que estimula a liberação de GtHs e posteriormente na maturação gonadal, demonstrando assim, a complexidade fisiológica observada nos

neurônios produtores de GnRHs. A partir deste ponto, será abordado, como agem estes neuro-hormônios quando são liberados diretamente na hipófise de peixes teleósteos.

#### 1.4. Hipófise, células gonadotrópicas (GtHs)

A hipófise em peixes é dividida em duas regiões distintas: a adeno-hipófise (ADH, tecido glandular endócrino) e a neuro-hipófise (NH, origem nervosa), identificadas de acordo com os diferentes tipos celulares (Weltzien et al., 2004; Levavi-Sivan et al., 2010; Zohar et al., 2010). Em relação aos hormônios hipofisários, na região da NH são encontradas as terminações axonais dos neurônios hipotalâmicos, que em geral, nos teleósteos, liberam os neuro-hormônios, como por exemplo, a arginina – vasotocina (AVT), a isotocina (IST) e o hormônio concentrador de melanina (MCH), entre outros neuropeptídeos (Acher, 1996; Batten et al., 1999; Duarte et al., 2001; Weltzien et al., 2004; Kawauchi, 2006). Apesar da NH estar diretamente relacionada com a reprodução, os estudos sobre o controle neuroendócrino das funções hipofisárias em teleósteos requerem o conhecimento da morfologia da hipófise, inervação dessa glândula e a identificação e localização dos diferentes tipos celulares encontrados na região da ADH (Weltzien et al., 2004; Levavi-Sivan et al., 2010; Zohar et al., 2010).

Em geral, a ADH em peixes é subdividida em três regiões distintas, no que diz respeito ao arranjo e localização topográfica das células, características tintoriais dessas células e distribuição dos ramos da NH (Cala et al., 2003; Laiz-Carrión et al., 2003; Weltzien et al., 2004; Cinquetti & Dramis, 2006; Kawauchi & Sower, 2006). Essas regiões são denominadas de: “*pars intermedia*” (PI), “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). Na PI encontram-se as células produtoras de melanotropina (MSH) e as células produtoras de somatolactina (SL). Na PPD localizam-se as células produtoras de GtHs (FSH e LH), as células produtoras de tireotropina (TSH) e as células produtoras de hormônio de crescimento (GH), este último, também conhecido hormônio somatotrópico. Já a RPD contém as células produtoras de prolactina (PRL) e as células produtoras de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Adicionalmente, segundo Kawauchi & Sower (2006), os hormônios adeno-hipofisários podem ser agrupados conforme a sua similaridade estrutural e funcional em 3 famílias: a família derivada de proopiomelanocortina, que abrange o ACTH e o MSH; a família da prolactina/somatotropina, que inclui PRL, GH e SL; e a família dos hormônios glicoprotéicos, que contém as GtHs e TSH (Agulleiro et al., 2006; Kawauchi & Sower, 2006; Takei & Loretz, 2006).

É importante salientar que todos esses hormônios, exceto a SL, estão presentes também nos outros vertebrados (Ono et al., 1990; Kaneko, 1996). Proopiomelanocortina (POMC) é um precursor protéico de vários hormônios, como por exemplo, o ACTH, o MSH e  $\beta$ -endorfina (Kawauchi & Sower, 2006). O papel fisiológico de ACTH é estimular a síntese e liberação de cortisol no tecido inter-renal de teleósteos (Segura-Noguera et al., 2000), sendo que, este hormônio atua em vários processos fisiológicos, como por exemplo, no metabolismo, nos aspectos relacionados ao estresse e na osmorregulação (Segura-Noguera et al., 2000; Kawauchi & Sower, 2006). Em relação ao MSH, o papel fisiológico desse hormônio em teleósteos é estimular a dispersão dos grânulos de pigmentos nos melanócitos, produzindo assim uma rápida mudança de coloração em peixes (Cala et al., 2003; Kawauchi & Sower, 2006).

Sabe-se ainda, que o papel fisiológico da PRL em teleósteos, está relacionado principalmente com a osmorregulação (Segura-Noguera et al., 2000; Forsyth & Wallis, 2002; Cala et al., 2003; Kawauchi & Sower, 2006; Mancera & Fuentes, 2006). Adicionalmente, alguns estudos indicam que a PRL esteja envolvida também na reprodução e nos aspectos relacionados ao estresse (Cala et al., 2003). O GH tem um papel fundamental na regulação do crescimento e desenvolvimento em teleósteos, além de estar envolvido em outros processos fisiológicos, como por exemplo, osmorregulação, reprodução e metabolismo (Segura-Noguera et al., 2000; Forsyth & Wallis, 2002; Cala et al., 2003; Agulleiro et al., 2006; Kawauchi & Sower, 2006).

As células produtoras de SL, também conhecidas como *PIPAS-cells*, foram primeiramente descritas por Ono et al. (1990) e Rand-Weaver et al. (1991a, b), e até o momento este hormônio só foi encontrado em peixes (Kaneko, 1996; Kawauchi & Sower, 2006). Apesar de ser um hormônio descoberto há cerca de 20 anos, o verdadeiro papel fisiológico da SL em peixes ainda continua desconhecido. Algumas evidências indicam que a SL esteja envolvida em vários processos fisiológicos, como por exemplo: no metabolismo, na regulação ácido-básica e na osmorregulação (Kakizawa et al., 1993, 1995a, b; Kaneko, 1996), no desenvolvimento embriológico (Laiz-Carrión et al., 2003), nos aspectos relacionados ao estresse (Rand-Weaver et al., 1993; Kaneko, 1996), na reprodução (Olivereau & Rand-Weaver, 1994; Kaneko, 1996; Johnson et al., 1997; Vissio et al., 1997; Mousa & Mousa, 2000) e na produção de esteróides sexuais (Planas et al., 1992; Mayer et al., 1998).

Em relação ao TSH, as possíveis funções fisiológicas deste hormônio seriam: na metamorfose em Pleuronectiformes (Schreiber & Specker, 1999), no desenvolvimento ontogenético (larval) (Laiz-Carrión et al., 2003) e indiretamente na reprodução, pois, foi

observado que o hormônio tireoídiano ( $T_3$ ) intensifica o efeito estimulatório do GnRH em *Salmo trutta* (Mylonas et al., 1994) e outros trabalhos sugerem que os hormônios tireoídianos agem sinergisticamente com as GtHs (Mylonas et al., 1994).

As GtHs são glicoproteínas responsáveis pela estimulação das células foliculares (em fêmeas) e das células de Leydig (em machos), na síntese dos andrógenos, progestágenos e estrógenos (Kawauchi & Sower, 2006; Lubzens et al., 2010), e conseqüentemente na vitelogênese, indução da maturação final e na ovulação (em fêmeas) e na espermatogênese, espermição e motilidade dos espermatozoides (em machos) (Zohar & Mylonas, 2001; Levavi-Sivan et al., 2010; Schulz et al., 2010).

É importante salientar que as células gonadotrópicas possuem variações de número, tamanho, intensidade de grânulos e de vacuolização durante o ciclo reprodutivo (Kawauchi & Sower, 2006). O método mais adequado para identificar as células gonadotrópicas é a reação de imuno-histoquímica, entretanto, ao utilizar anticorpos de mamíferos para GtHs em peixes, observa-se uma marcação, em menor intensidade, nas células TSH. Esta reação cruzada ocorre devido à similaridade estrutural das moléculas dos hormônios gonadotrópicos e tireotrópicos, pois, essas moléculas constituem-se de duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$  (Yaron et al., 2001). A subunidade  $\alpha$  é comum aos três hormônios (FSH, LH e TSH) e a subunidade  $\beta$  varia, sendo responsável pela atividade biológica do hormônio (Kawauchi & Sower, 2006; Levavi-Sivan et al., 2010).

A presença de duas GtHs foi identificada em várias espécies de peixes (revisão em Kawauchi & Sower, 2006; Levavi-Sivan et al., 2010), no entanto, o padrão de distribuição das células gonadotrópicas varia entre os diferentes estádios do ciclo reprodutivo (Nozaki et al., 1990a, b), como observado em salmonídeos, nos quais, em indivíduos jovens o número de células de FSH é significativamente maior que o número de células de LH durante os primeiros estágios da espermatogênese e vitelogênese. Já nos animais maduros, o número de células de LH excede as células de FSH (Nozaki et al., 1990a, b). Adicionalmente, a presença de duas GtHs em Siluriformes foi por muito tempo uma questão enigmática, devido à dificuldade na identificação das GtHs nestas espécies (Schulz et al., 1995; Agulleiro et al., 2006). Todavia, Zmora et al. (2007) foram um dos pioneiros na caracterização das GtHs em espécies de Siluriformes através de um sistema de expressão de proteínas recombinantes baseado em células eucarióticas (*Drosophila expression system*).

Em relação às espécies nacionais, trabalhos que identificaram as células de FSH e de LH ainda são escassos (Borella et al., 1997; Parreira, 1998; Beolchi et al., 2003; Borella et al., 2003; Antoneli, 2006; Nóbrega, 2006; Honji, 2007; Borella et al., 2009). Alguns estudos

indicam que as GtHs são afetadas quando espécies migradoras são transferidas para o cativeiro e conseqüentemente têm a sua reprodução boqueada, uma vez que, na cascata de estimulação da síntese dos esteróides gonadais, a produção de  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DHP (hormônio indutor da maturação final, ovulação e desova) é estimulada pelas GtHs (principalmente pelo LH) (Peter & Yu, 1997; Lubzens et al., 2010), como descrito anteriormente. O LH chega às células da teca e estimula a conversão da  $17\alpha$ -OHP, que é transportada às células foliculares e convertida na  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DHP. Este último é considerado um hormônio crítico na preparação do oócito para a fertilização (Peter & Yu, 1997; Nagahama, 1997; Planas et al., 2000; Lubzens et al., 2010). Apesar da importância da  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DHP, nenhum estudo em espécies neotropicais foi realizado até o momento, sendo que, a  $17\alpha$ -OHP, é o hormônio precursor mais próximo da  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DHP, e que pode ser facilmente obtido em análises laboratoriais. Como a conversão de  $17\alpha$ -OHP para  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DHP é potencializada pela ação da  $20\beta$ -HSD (Nagahama, 1994), sugerindo que o confinamento dos animais em cativeiro estaria afetando a ação desta enzima ( $20\beta$ -HSD), haja vista de que a atuação da  $20\beta$ -HSD (Nagahama, 1994) depende dos estímulos das GtHs (principalmente do LH). Segundo Amaral et al. (2007), foi observado que em reprodutores de *Salminus hilarii* (Ostariophysi: Characiformes) quando mantidos em cativeiro, as fêmeas acumulam a  $17\alpha$ -OHP e não conseguem convertê-la em  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DHP, e por isso, talvez estes animais não consigam se reproduzir em cativeiro sem a intervenção hormonal exógena. Adicionalmente, estes autores indicam que nesta espécie uma falha na síntese de LH nos estágios finais da maturação oocitária pode ocorrer.

Ainda dentro deste contexto, três disfunções reprodutivas em peixes são identificadas quando os reprodutores selvagens são transferidos para o cativeiro e/ou quando sofrem condições de cultivo: a) completa ausência do desenvolvimento dos gametas, ou seja, a espermatogênese e a vitelogênese falham completamente quando os animais são mantidos em cativeiro, este processo pode ser observado em enguias, *A. anguilla* (Zohar & Mylonas, 2001; van Ginneken & Maes, 2005); b) apenas ausência na liberação dos oócitos, ou seja, ocorre a ovulação mas não a liberação dos oócitos, como identificado em cultivo de salmonídeos (Bromage et al., 1992); c) falha na maturação final, ovulação e desova, quando os oócitos apresentam a vitelogênese completa, ou seja, quando os oócitos estão completamente desenvolvidos e aptos para a maturação final (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010). Para a maioria das espécies neotropicais, a falha da reprodução em cativeiro indica principalmente, a falha na maturação final, ovulação e desova. Além disso, uma baixa qualidade e/ou quantidade de espermatozóides e de oócitos também podem ser observada nas

espécies neotropicais (Brooks et al., 1997; Caneppele et al., 2009; Bobe & Labbé, 2010; Lubzens et al., 2010; Honji et al., 2011).

De uma forma geral, apesar do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas ser responsável pelo controle endócrino da reprodução em peixes, o conhecimento da fisiologia deste eixo para as espécies neotropicais ainda é bastante escasso. Os mecanismos fisiológicos que levam ao bloqueio da reprodução em peixes reofílicos, quando estes são impedidos de migrar como, por exemplo, em operações de cultivo em cativeiro, ainda não são bem compreendidos. Como apresentado anteriormente, para as espécies nacionais a disfunção que ocorre normalmente é a ausência da maturação final, ovulação e desova dos oócitos (*i.e.*, migração e “quebra” da vesícula germinativa) e o seu motivo ainda não está claro. Além disso, segundo Melo (2007) que comparou a expressão de FSH e LH em *S. hilarii*, adicionado ao trabalho de Honji (2007) que analisou as células produtoras de FSH, LH, GH, SL e PRL, através de reações de histoquímica e de imuno-histoquímica nesta mesma espécie, é sugerido que o insucesso na reprodução em cativeiro seja devido a alguma disfunção na ADH, sugerindo também uma análise sobre o GnRH.

Em resumo, os estudos relacionando o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e a disfunção endócrina de peixes em cativeiro são escassos mesmo em espécies de clima temperado, e raros em peixes de clima tropical. Esta manutenção dos peixes reofílicos em cativeiro também é acompanhada por uma atresia oocitária, cuja dinâmica morfológica é praticamente desconhecida nas espécies neotropicais. Além disso, as análises das gônadas, bem como as modificações morfológicas dos mesmos durante o ciclo reprodutivo e a produção de substâncias sintetizadas pelas gônadas, ou seja, o perfil de esteróides gonadais, também são alvos do presente estudo. Finalmente, atingir esta meta exigirá um enorme esforço de pesquisadores para gerar conhecimentos importantes para a conservação de espécies, inclusive aquelas ameaçadas de extinção.

## **2. Breve descrição do modelo biológico e a importância de *Steindachneridion parahybae***

No anexo 1 encontra-se uma breve descrição de *S. parahybae*, como por exemplo, identificação, distribuição geográfica (Fig. 7), e alguns aspectos da abundância, habitat, ecologia, reprodução e conservação (estado de conservação, ameaças, ações e recomendações para a conservação) do surubim do Paraíba. No anexo 2, são apresentados os dados da reprodução induzida dos reprodutores de origem selvagem de *S. parahybae* (primeira geração, F1), que originaram os reprodutores nascidos e criados em cativeiro e que foram utilizados no presente estudo.

### 3. Objetivo geral

Considerando-se todos os pontos que foram expostos sobre o controle endócrino da reprodução de peixes teleósteos, os problemas encontrados por estes animais em condições de confinamento, e finalmente ao total desconhecimento da fisiologia reprodutiva de *S. parahybae*, o objetivo geral do presente trabalho foi estudar a fisiologia do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas de *S. parahybae* ao longo do ciclo reprodutivo, assim como, os eventos fisiológicos e morfológicos envolvidos na fase pós-desova dessa espécie. Os resultados obtidos podem fornecer subsídios para a melhor compreensão da fisiologia reprodutiva de peixes reofílicos quando transferidos para o cativeiro, principalmente no caso de *S. parahybae*, para que esta espécie não corra o risco de ser extinta sem nem mesmo ter a sua fisiologia reprodutiva compreendida, premissa básica para um futuro trabalho de repovoamento da espécie.

#### 3.1. Objetivos específicos

Para atingir este objetivo geral apresentado acima, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

1) Quantificar as concentrações plasmáticas dos esteróides gonadais ( $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona, testosterona e 11-cetotestosterona), durante o ciclo reprodutivo e após a desova, correlacionando com as mudanças do epitélio germinativo ovariano e o comprometimento de possíveis alterações destes hormônios em peixes privados de migração reprodutiva;

2) Identificar, localizar e caracterizar os diferentes tipos celulares da adeno-hipófise de *S. parahybae*, e utilizar estudos de morfologia geral, citoquímica e imunohistoquímica para verificar a ocorrência de possíveis alterações dessas células durante o ciclo reprodutivo e desova induzida em cativeiro;

3) Investigar a distribuição neuro-anatômica do hormônio liberador de gonadotropinas e suas possíveis isoformas em *S. parahybae*, correlacionando-o com o ciclo reprodutivo e desova induzida em cativeiro;

4) Descrever os aspectos da reprodução artificial e fertilização dos gametas de reprodutores nascidos e criados em cativeiro de *S. parahybae*, assim como, analisar e caracterizar os aspectos macroscópicos das gônadas do surubim do Paraíba;

5) Analisar os eventos morfológicos relacionados com o desenvolvimento embrionário e larval de *S. parahybae* induzidos à reprodução em cativeiro, desde a ativação do oócito até o início da fase juvenil.

### 3.2. Capítulos

Os capítulos descritos a seguir são esboços de artigos científicos que serão posteriormente modificados, sintetizados e formatados a fim de atender às exigências das revistas científicas.

#### 3.2.1. Capítulo 2

Desenvolvimento ovariano e perfil de esteróides sexuais plasmáticos em *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae), durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução.

#### 3.2.2. Capítulo 3

Células hipofisárias de fêmeas de *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) durante a oogênese e a reprodução induzida em cativeiro.

#### 3.2.3. Capítulo 4

Caracterização, distribuição e localização das diferentes formas do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) no encéfalo e na hipófise de *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução em cativeiro.

#### 3.2.4. Capítulo 5

Caracterização macroscópica das gônadas e reprodução induzida em cativeiro de *Steindachneridion parahybae* (Teleostei: Siluriformes), uma espécie ameaçada de extinção.



### 3.2.5. Capítulo 6

Desenvolvimento embrionário e estágios larvais de *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). Implicações para a conservação e cultivo desta espécie Neotropical ameaçada.

### 3.2.6. Capítulo 7

Eixo hipotálamo-hipófise-gônadas de *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). Discussão geral, considerações finais e perspectivas futuras.

## 4. Referências bibliográficas

- Acher, R. 1996. Molecular evolution of fish neurohypophysial hormones: neutral and selective evolutionary mechanisms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102: 157-172.
- Agulleiro, B.; Garcia-Hernández, M. P. & García-Ayala, A. 2006. Teleost adenohypophysis: morphofunctional and developmental aspects. Pp: 287-323. In: Reinecke, M.; Zaccane, G. & Kappor, B. G. (Eds.). *Fish Endocrinology*. Science Publishers. vol. 1.
- Akazome, Y.; Kanda, S.; Okubo, K. & Oka, Y. 2010. Functional and evolutionary insights into vertebrate kisspeptin systems from studies of fish brain. *J. Fish Biol.* 76: 161-182.
- 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. *Comp. Biochem. Physiol.* 148A (Suppl. 1): S44.
- Antoneli, F. N. 2006. Perfil morfo-funcional da inversão de sexo em Synbranchidae (Teleostei: Synbranchiformes). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 164p.
- Ballenger, J. C. 2007. Genetic effects on the production of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) female X blue catfish (*Ictalurus furcatus*) male hybrid fry. PhD Thesis. Auburn University. 132p.
- Batten, T. F. C.; Moons, L. & Vandesande, F. 1999. Innervation and control of the adenohypophysis by hypothalamic peptidergic neurons in teleost fishes: EM immunohistochemical evidence. *Microsc. Res. Techniq.* 44: 19-35.
- Beolchi, G. S.; Batlouni, S. R.; Romagosa, E. & Borella, M. I. 2003. Estudos histoquímicos e imuno-histoquímicos da hipófise de cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* criados em cativeiro. In: Congresso Científico do ICB-USP. São Paulo-SP, Brasil.

- Blázquez, M. & Somoza, G. M. 2010. Fish with thermolabile sex determination (TSD) as models to study brain sex differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166: 470-477.
- Blázquez, M.; Bosma, P. T.; Fraser, E. J.; Van Look, K. J. W. & Trudeau, V. L. 1998. Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comp. Biochem. Physiol.* 119C: 345-364.
- Bluher, S. & Mantzoros, C. S. 2007. Leptin in reproduction. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* 14: 458-464.
- Bobe, J. & Labbé, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 535-548.
- Bogerd, J.; Li, K. W.; Janssen-Dommerholt, C. & Goos, H. 1992. Two gonadotropin-releasing hormones from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biochem. Biophys. Res. Co.* 187: 127-134.
- Bogerd, J.; Zandbergen, T.; Anderson, E. & Goos, H. 1994. Isolation, characterization and expression of cDNAs encoding the catfish-type and chicken-II-type gonadotropin-releasing-hormone precursors in the African catfish. *Eur. J. Biochem.* 222: 541-549.
- Borella, M. I.; Batlouni, S. R.; Venturieri, R. & Mancera, J. M. 2003. Hipófise de aruanã *Osteoglossum bicirrhosum* Cuvier, 1824. Histoquímica e imuno-histoquímica. In: Congresso Científico do ICB-USP. São Paulo-SP, Brasil.
- Borella, M. I.; Gazola, R.; Val-Sella, M. V. & Fava-de-Moraes, F. 1997. Histochemical and immunohistochemical study of the pituitary gland of the South-American teleost pacu fish *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). *Braz. J. Morphol. Sci.* 14(2): 219-225.
- Borella, M. I.; Venturieri, R. & Mancera, J. M. 2009. Immunocytochemical identification of adenohypophyseal cells in the pirarucu (*Arapaima gigas*), an Amazonian basal teleost. *Fish Physiol. Biochem.* 35: 3-16.
- Brasil. 2004. Instrução normativa N° 05 de 21 de maio de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Ministério do Meio Ambiente.
- Breton, B. & Weil, C. 1973. Effect of synthetic LH-FSH releasing hormone and hypothalamic extracts of the carp on in vivo gonadotropic hormone secretion in the carp (*Cyprinus carpio* L.). *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances. Acad. Sci. D.* 277: 2061-2064.
- Bromage, N.; Jones, J.; Randall, C.; Thrush, M.; Davies, B.; Springate, J.; Duston, J. & Barker, G. 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100: 141-166.
- Brooks, S.; Tyler, C. R. & Sumpter, J. P. 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg?

- Rev. Fish Biol. Fisher. 7: 387-416.
- Brujls, M. C. M. & Durif, C. M. D. 2009. Silver eel migration and behavior. Pp: 65-95. In: van-den-Thillart, G.; Dufour, S. & Rankin, J. C. (Eds.). Spawning migration of the European eel. reproduction index, a useful tool for conservation management. Springer.
- Cala, F. S.; Portillo, A.; Martín del Río, M. P. & Mancera, J. M. 2003. Immunocytochemical characterization of adenohipophyseal cells in the greater weever fish (*Trachinus draco*). Tissue & Cell 35: 169-178.
- Caneppele D.; Pompeu, P. & Garavello, J. 2008. *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1876). Pp: 236-238. In: Machado, A. B. M.; Drummond, G. M. & Paglia, A. P. (Eds.). Livro vermelho da fauna Brasileira ameaçada de extinção. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Departamento de Conservação da Biodiversidade. Brasília, DF.
- Caneppele, D., Honji, R. M.; Hilsdorf, A. W. S. & Moreira, R. G. 2009. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). Neotrop. Ichthyol. 7(4): 759-762.
- Carolsfeld, J.; Powell, J. F.; Park, M.; Fischer, W. H.; Craig, A. G.; Chang, J. P.; Rivier, J. E. & Sherwood, N. M. 2000. Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, from an ancient teleost, herring. Endocrinology 141: 505-512.
- Chiba, A.; Oka, S. & Honma, Y. 1994. Ontogenetic development of gonadotropin-releasing hormone-like immunoreactive neurons in the brain of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. Neurosci. Lett. 178: 51-54.
- Cinquetti, R. & Dramis, L. 2006. Identification and localization of hormone-producing cells in the pituitary of male *Padogobius martensi* (Pisces, Gobiidae): a histochemical and immunocytochemical study. J. Fish Biol. 68 (Supplement B): 235-250.
- Conlon, J. M.; Collin, F.; Chiang, Y-C.; Sower, S. A. & Vaudry, H. 1993. Two molecular forms of gonadotropin releasing hormone from the brain of the frog *Rana ridibunda*: purification, characterization, and distribution. Endocrinology 132: 2117-2120.
- CRBio2. 2009. Rio Paraíba do Sul pede socorro. Disponível em: <<http://portal.crbio-02.gov.br/Informativo/Mar09.pdf>>. Acessado em: 28 set. 2009.
- Donovan, B. T. & Harris, G. W. 1954. Effects of pituitary stalk section light-induced oestrus in the ferret. Nature 174: 503-504.

- Duarte, G.; Noguera, M. M. S.; Martín del Río, M. P. & Mancera, J. M. 2001. The hypothalamo-hypophyseal system of the white seabream *Diplodus sargus*: immunocytochemical identification of arginine-vasotocin, isotocin, melanin-concentrating hormone and corticotropin-releasing factor. *Histochem. J.* 33: 568-578.
- Dubois, E. A.; Zandbergen, M. A.; Peute, J. & Goos, H. 2002. Evolutionary development of three gonadotropin releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain Res. Bull.* 57(3/4): 413-418.
- Dubois, E. A.; Zandbergen, M. A.; Peute, J.; Bogerd, J. & Goos, H. J. T. 2001. Development of three distinct GnRH neuron populations expressing two different GnRH forms in the brain of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *J. Comp. Neurol.* 437: 308-320.
- Dufour, S.; Weltzien, F. A.; Sebert, M. E.; Belle, N. L.; Vidal, B.; Vernier, P. & Pasqualini, C. 2005. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes. Ecophysiological and evolutionary implications. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 1040: 9-21.
- Falcón, J.; Besseau, L.; Sauzet, S. & Boeuf, G. 2007. Melatonin effects on the hypothalamus-pituitary axis in fish. *Trends Endocrin. Met.* 18(2): 81-88.
- Falcón, J.; Migaud, H.; Muñoz-Cueto, J. A. & Carrillo, M. 2010. Current knowledge on the system in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 469-482.
- Fernald, R. D. & White, R. B. 1999. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Front. Neuroendocrinol.* 20: 224-240.
- Fiszbein, A.; Cánepa, M.; Vázquez, G. R.; Maggese, C. & Pandolfi, M. 2010. Photoperiodic modulation of reproductive physiology and behavior in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Physiol. Behav.* 99: 425-432.
- Forsyth, I. A. & Wallis, M. 2002. Growth hormone and prolactin-molecular and functional evolution. *J. Mammary Gland Biol.* 7(3): 291-312.
- van Ginneken, V. & Maes, G. 2005. The European eel (*Anguilla anguilla* Linnaeus) its lifecycle evolution and reproduction: a literature review. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15: 367-398.
- González-Martínez, G.; Madigou, T.; Zmora, N.; Anglade, I.; Zanuy, S.; Zohar, Y.; Elizur, A.; Muñoz-Cueto, J. A. & Kah, O. 2001. Differential expression of three different prepo-GnRH (gonadotropin-releasing hormone) messengers in the brain of the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Comp. Neurol.* 429: 144-155.
- González-Martínez, G.; Zmora, N.; Mañanos, E.; Saligaut, D.; Zanuy, S.; Zohar, Y.; Elizur, A.; Kah, O. & Muñoz-Cueto, J. A. 2002. Immunohistochemical localization of three different prepo-GnRHs in the brain and pituitary of the European seabass

- (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides. *J. Comp. Neurol.* 446: 95-113.
- González-Martínez, G.; Zmora, N.; Saligaut, D.; Zanuy, S.; Elizur, A.; Kah, O. & Muñoz-Cueto, J. A. 2004. New insights in development origins of different GnRH (gonadotropin-releasing hormone) systems in Perciform fish: an immunohistochemical study in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Chem. Neuroanat.* 28: 1-15.
- Goos, H.; Bosma, P. T.; Bogerd, J.; Tensen, C. P.; Li, K. W.; Zandbergen, M. A. & Schulz, R. W. 1997. Gonadotropin-releasing hormones in the African catfish: molecular forms, localization, potency and receptors. *Fish Physiol. Biochem.* 17: 45-51.
- Guiguen, Y.; Fostier, A.; Piferrer, F. & Chang, C. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 352-366.
- Guilgur, L. G. 2008. Caracterización del sistema GnRHérgico en el pejerrey *Odontesthes bonariensis*: expresión génica, localización neuroanatómica y evolución de GnRH y sus receptores. PhD Tesis. Universidad Nacional de General San Martín. 213p.
- Guilgur, L. G.; Moncaut, N. P.; Canario, A. V. M. & Somoza, G. M. 2006. Evolution of GnRH ligands and receptors in Gnathostomata. *Comp. Biochem. Physiol.* 144A: 272-283.
- Guyton, A. C. & Hall, J. E. 2006. Textbook of medical physiology. 11ed. Elsevier's Health Sciences: Philadelphia, United States of America. 1152p.
- Hoar, W. S. 1969. Reproduction. Pp: 1-72. In: Hoar, W. S. & Randall, D. J. (Eds.). *Fish physiology*. Academic Press. New York and London.
- Hochachka, P. W. & Somero, G. N. 2002. Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution. Oxford. University Press. 466p.
- Honji, R. M. 2007. Caracterização endócrina durante o ciclo reprodutivo da tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae), em três ambientes distintos: natural, impactado e cativo. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 190p.
- Honji, R. M.; Caneppele, D.; Hilsdorf, A. W. S. & Moreira, R. G. 2009. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). *Environ. Biol. Fish.* 85(3): 207-208.
- Honji, R. M.; Mello, P. H.; Araújo, B. C.; Rodrigues-Filho, J. A.; Hilsdorf, A. W. S. & Moreira, R. G. 2011. Influence of spawning procedure on gametes fertilization success in *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae): implications for the conservation of this species. *Neotrop. Ichthyol.* 9(2): 363-370.

- Iwakoshi, E.; Kuroda, K. T.; Fujisawa, Y.; Hisada, M.; Ukena, K.; Tsutsui, K. & Minakata, H. 2002. Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 291: 1187-1193.
- Johnson, L. L.; Norberg, B.; Willis, M. L.; Zebroski, H. & Swanson. 1997. Isolation, characterization and radioimmunoassay of Atlantic halibut somatolactin and plasma levels during stress and reproduction in flatfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105: 194-209.
- Kah, O.; Lethimonier, C.; Somoza, G.; Guilgur, L. G.; Vaillant, C. & Lareyre, J. J. 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen. Com. Endocrinol.* 153: 346-364.
- Kah, O.; Madigou, T.; Mazurais, D. & Dréan, G. L. 1999. Aspects of the central regulation of reproduction in teleost fish. Pp: 27-34. In: Norberg, B.; Kjesbu, O. S.; Taranger, G. L.; Andersson, E. & Stefasson, S. O. (Eds.). 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Bergen.
- Kakizawa, S.; Kaneko, T.; Hasegawa, S. & Hirano, T. 1993. Activation of somatolactin cells in the pituitary of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by low environmental calcium. *Gen. Comp. Endocrinol.* 91: 298-306.
- Kakizawa, S.; Kaneko, T.; Hasegawa, S. & Hirano, T. 1995a. Effects of feeding, fasting, background adaptation, acute stress and exhaustive exercise on the plasma somatolactin concentrations in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 98: 137-146.
- Kakizawa, S.; Kaneko, T.; Ogasawara, T. & Hirano, T. 1995b. Changes in plasma somatolactin levels during spawning migration of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Fish Physiol. Biochem.* 14: 93-191.
- Kaneko, T. 1996. Cell biology of somatolactin. *Int. Rev. Cytol.* 169: 1-24.
- Kavanaugh, S. I.; Nozaki, M. & Sower, S. A. 2008. Origins of GnRH in vertebrates: identification of a novel GnRH in a basal vertebrate, the sea lamprey. *Endocrinology* 149: 3860-3869.
- Kawauchi, H. & Sower, S. A. 2006. The dawn and evolution of hormones in the adenohipophysis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148: 3-14.
- Kawauchi, H. 2006. Functions of melanin-concentrating hormone in fish. *J. Exp. Zool. (A)*. 305: 751-760.
- Kobayashi, M.; Amano, M.; Kim, M. H.; Yoshiura, Y.; Sohn, Y. C.; Suetake, H. & Aida, K. 1997. Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin in goldfish and masu salmon. *Fish Physiol. Biochem.* 17: 1-8.

- Koide, Y.; Noso, T.; Schouten, G.; Peute, J.; Zandbergen, M. A.; Bogerd, J.; Schulz, R. W.; Kawauchi, H. & Goos, H.J. 1992. Maturational gonadotropin from the African catfish, *Clarias gariepinus*: purification, characterization, localization and biological activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 87 (3): 327-341.
- Laiz-Carrión, R.; Segura-Noguera, M. D. M.; Martín-del-Río, M. D. P. & Mancera, J. M. 2003. Ontogeny of adenohipophyseal cells in the pituitary of the American shad (*Alosa sapidissima*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 132: 454-464.
- Lance, V. A. 2009. Is regulation of aromatase expression in reptiles the key to understanding temperature-dependent sex determination? *J. Exp. Zool.* 311A: 314-322.
- Lethimonier, C.; Madigou, T.; Muñoz-Cueto, J. A.; Lareyre, J. J. & Kah, O. 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptor in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135: 1-16.
- Levavi-Sivan, B.; Bogerd, J.; Mañanós, E. L.; Gómez, A. & Lareyre, J. J. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 412-437.
- Lovejoy, D. A.; Fischer, W. H.; Parker, D. B.; McRory, J. E.; Park, M.; Lance, V.; Swanson, P.; Rivier, J. E. & Sherwood, N. M. 1991a. Primary structure of two forms of gonadotropin releasing hormone from brains of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Regul. Peptides.* 33: 105-116.
- Lovejoy, D. A.; Sherwood, N. M.; Fischer, W. H.; Jackson, B. C.; Rivier, J. E. & Lee, T. 1991b. Primary structure of gonadotropin releasing hormone from the brain of a holocephalan (ratfish: *Hydrolagus colliei*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 82: 152-161.
- Lowe-McConnell, R. H. 1999. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. EDUSP. 534p.
- Lubzens, E.; Young, G.; Bobe, J. & Cerdà, J. 2010. Oogenesis in teleost: how fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 367-389.
- Lucas, M. C. & Baras, E. 2001. Migration of freshwater fishes. Blackwell Science. 420p.
- Luckenbach, J. A.; Dickey, J. T. & Swanson, P. 2010. Regulation of pituitary GnRH receptor and gonadotropin subunits by IGF-1 and GnRH in prepubertal male coho salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167: 387-396.
- MacColl, G.; Quinton, R. & Bouloux, P. M. 2002. GnRH neuronal development: insights into hypogonadotrophic hypogonadism. *Trends Endocrinol. Metab.* 13: 112-118.
- Mancera, J. M. & Fuentes, J. 2006. Osmoregulatory action of hypophyseal hormones in teleosts. Pp: 393-417. In: Reinecke, M.; Zaccone, G. & Kappor, B. G. (Eds.). *Fish Endocrinology*. Science Publishers. vol. 1.

- Mayer, I.; Rand-Weaver, M. & Borg, B. 1998. Effects of gonadectomy and steroids on plasma and pituitary levels of somatolactin in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Gen. Comp. Endocrinol. 109: 223-231.
- Mazumdar, M.; Sakharkar, A. J.; Singru, P. S. & Subhedar, N. 2007. Reproduction phase-related variations in neuropeptide Y immunoreactivity in the olfactory system, forebrain, and pituitary of the female catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). J. Comp. Neurol. 504: 450-469.
- Melo, R. G. 2007. Caracterização da expressão do RNAm das gonadotropinas de *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) ao longo do ciclo reprodutivo: efeitos do bloqueio reprodutivo. Dissertação de Mestrado. Universidade de Mogi das Cruzes. 58p.
- Migaud, H.; Davie, A. & Taylor, J. F. 2010. Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. J. Fish Biol. 76: 27-68.
- Milla, S.; Wang, N.; Mandiki, S. N. M. & Kestemont, P. 2009. Corticosteroids: friends or foes of teleost fish reproduction? Comp. Biochem. Physiol. 153A: 242-251.
- Millam, J. R.; Ottinger, M. A.; Craig-Veit, C. B.; Fan, Y.; Chaiseha, Y. & Halawani, M. E. E. 1998. Multiple forms of GnRH are released from perfused medial basal hypothalamic/preoptic area (MBH/POA) explants in birds. Gen. Comp. Endocrinol. 111: 95-101.
- Miyamoto, K.; Hasegawa, Y.; Igarashi, M.; Chino, N.; Sakakibara, S.; Kangawa, K. & Matsuo, H. 1983. Evidence that chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone is [Gln<sup>8</sup>]LHRH. Life Sci. 32: 1341-1347.
- Montaner, A. D.; Mongiat, L.; Lux-Lantos, V. A.; Warby, C.; Chewpoy, B.; Bianchi, M. S.; Libertun, C.; Rivier, J. E.; Sherwood, N. M. & Somoza, G. M. 2002. Guinea pig gonadotropin-releasing hormone (gpGnRH): expression pattern, characterization and biological activity in rodents. Neuroendocrinology 75: 326-338.
- Montaner, A. D.; Park, M.; Fischer, W. H.; Craig, A. G.; Chang, J. P.; Somoza, G. M.; Rivier, J. E. & Sherwood, N. M. 2001. Primary structure of a novel gonadotropin-releasing hormone (GnRH) variant in the brain of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). Endocrinology 142: 1453-1460.
- Mousa, M. A. & Mousa, S. A. 2000. Implication of somatolactin in the regulation of sexual maturation and spawning of *Mugil cephalus*. J. Exp. Zool. 287: 62-73.
- Moyle, P. B. & Cech, J. J. 2003. Fishes. An introduction to ichthyology. Prentice Hall, Upper Saddle River. New Jersey. 590p.



- Munakata, A. & Kobayashi, M. 2010. Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 465-468.
- Muske, L. E. 1997. Organization of multiple molecular forms of GnRH. Pp: 145-180. In: Parhar, I. S. & Sakuma, Y. (Eds.). *GnRH neurons. Gene to behavior.* Brain Shuppan, Tokyo.
- Mylonas, C. C.; Fostier, A. & Zanuy, S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 516-534.
- Mylonas, C. C.; Sullivan, C. V. & Hinshaw, J. M. 1994. Thyroid hormones in brown trout (*Salmo trutta*) reproduction and early development. *Fish Physiol. Biochem.* 13(6): 485-493.
- Nagahama, Y. & Yamashita, M. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev. Growth Differ.* 50: 195-219.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38: 217-229.
- Nagahama, Y. 1997.  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids.* 62: 190-196.
- Nelson, J. S. 1994. *Fishes of the World.* 2<sup>nd</sup> Ed. New York. Wiley – Interscience. 600p.
- Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the World.* 4<sup>th</sup> Ed. New York. Wiley – Interscience. 601p.
- Ngamvongchon, S.; Sherwood, N. M.; Warby, C. M. & Rivier, J. E. 1992. Gonadotropin-releasing hormone from Thai catfish: chromatographic and physiological studies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 87: 266-274.
- Nóbrega, R. H. 2006. Alterações do epitélio germinativo masculino, células endócrinas testiculares e células gonadotrópicas durante o ciclo reprodutivo de *Serrasalmus spilopleura* (Kner, 1859) e *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 185p.
- Nóbrega, R. H. 2011. Padronização das técnicas de transplante de espermatogônias em zebrafish (*Danio rerio*) e utilização desta espécie como modelo experimental para se investigar a biologia das espermatogônias tronco em teleósteos. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 120p.
- Norris, D. O. 2007. *Vertebrate endocrinology.* 4Ed. Elsevier. 550p.
- Nozaki, M.; Naito, N.; Swanson, P.; Dickhoff, W. W.; Nakai, Y.; Suzuki, K. & Kawachi, H. 1990b. Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GtHI and GtHII cells in rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 77: 358-367.

- Nozaki, M.; Naito, N.; Swanson, P.; Miyata, K.; Nakai, Y.; Oota, Y.; Suzuki, K. & Kawauchi, H. 1990a. Salmonid pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GtHI and GtHII. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77: 348-357.
- Okubo, K. & Nagahama, Y. 2008. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiol.* 193: 3-15.
- Okubo, K.; Amano, M.; Yoshiura, Y.; Suetake, H. & Aida, K. 2000. A novel form of gonadotropin-releasing hormone in the Medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 276: 298-303.
- Okubo, K.; Sakai, F.; Lau, E. L.; Yoshizaki, G.; Takeuchi, Y.; Naruse, K.; Aida, K. & Nagahama, Y. 2006. Forebrain gonadotropin-releasing hormone neuronal development: insights from transgenic Medaka and the relevance to X-Linked Kallmann syndrome. *Endocrinology* 147(3): 1076-1084.
- Olivereau, M. & Ball, J. N. 1966. Histological study of functional ectopic pituitary transplants in fish (*Poecilia formosa*). *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 164: 106-129.
- Olivereau, M. & Rand-Weaver, M. 1994. Immunocytochemical study of the somatolactin cells in the pituitary of pacific salmon, *Oncorhynchus nerka*, and *O. keta* at some stages of the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 93: 28-35.
- Ono, M.; Takayama, Y.; Rand-Weaver, M.; Sakata, S.; Yasunaga, T.; Noso, T. & Kawauchi, H. 1990. cDNA cloning of somatolactin a new pituitary protein related to growth hormonal and prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4330-4334.
- Onuma, T. A.; Makino, K.; Ban, M.; Ando, H.; Fukuwaka, M.; Azumaya, T.; Swanson, P. & Urano, A. 2009. Elevation of the plasma level of insulin-like growth factor-I with reproductive maturation prior to initiation of spawning migration of chum salmon. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 1163: 497-500.
- Ookura, T.; Okuzawa, K.; Tanaka, H.; Gen, K. & Kagawa, H. 1999. The ontogeny of gonadotropin-releasing hormone neurons in the red seabream, *Pagrus major*. Pp: 47-49. In: Norberg, B.; Kjesbu, O. S.; Taranger, G. L.; Andersson, E. & Stefansson, S. O. (Eds.). 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Bergen.
- Ospina-Álvarez, N. & Piferrer, F. 2008. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PlosOne* 3(7): e2837.
- Pandolfi, M. 2005. Caracterización de las variantes de GnRH y las gonadotropinas en *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes) y su relación con la diferenciación sexual. PhD Tesis. Universidad de Buenos Aires, Argentina. 117p.

- Pandolfi, M.; Muñoz-Cueto, J. A.; Lo Nostro, F. L.; Downs, J. L.; Paz, D. A.; Maggesse, M. C. & Urbanski, H. F. 2005. GnRH systems of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae) revisited: a localization study with antibodies and riboprobes to GnRH-associated peptides. *Cell Tissue Res.* 321: 219-232.
- Pandolfi, M.; Parhar, I.; Ravaglia, M. A.; Meijide, F. J.; Maggese, C. C. & Paz, D. A. 2002. Ontogeny and distribution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems in the brain of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Anat. Embryol.* 205: 271-281.
- Parhar, I. S.; Iwata, M.; Pfaff, D. W. & Fukuda, M. 1995. Embryonic development of gonadotropin-releasing hormone neurons in the sockeye salmon. *J. Comp. Neurology.* 362: 256-270.
- Parreira, S. F. 1998. Células gonadotrópicas de curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Pisces, teleostei): estudo ultra-estrutural e imunohistoquímico. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo. 74p.
- Peter, R. E. & Yu, K. L. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basics applied aspects. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 7: 173-197.
- Planas, J. V.; Athos, J.; Goetz, F. W. & Swanson, P. 2000. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish. *Biol. Reprod.* 62: 1262-1269.
- Planas, J. V.; Swanson, P.; Rand-Weaver, M. & Dickhoff, W. W. 1992. Somatolactin stimulates in vitro gonadal steroidogenesis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 87: 1-5.
- Pough, F. H.; Janis, C. M. & Heiser, J. B. 2003. A vida dos vertebrados. Atheneu. 3ed. 699p.
- Powell, J. F. F.; Standen, E. M.; Carolsfeld, J.; Borella, M. I.; Gazola, R.; Fischer, W. H.; Park, M.; Craig, A. G.; Warby, C. M.; Rivier, J. E.; Val-Sella, M. V. & Sherwood, N. M. 1997. Primary structure of three forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the pacu brain. *Regul. Peptides* 68: 189-195.
- Powell, J. F.; Zohar, Y.; Elizur, A.; Park, M.; Fisher, W. H.; Craig, A. G.; Rivier, J. E.; Lovejoy, D. A. & Sherwood, N. 1994. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 12081-12085.
- Rand-Weaver, M.; Noso, T.; Muramoto, K. & Kawauchi, H. 1991a. Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and

- prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. *Biochemistry* 30: 1509-1515.
- Rand-Weaver, M.; Pottinger, T. G. & Sumpter, J. P. 1993. Plasma somatolactin concentrations in salmonid fish are elevated by stress. *J. Endocrinol.* 138(3): 509-515.
- Rand-Weaver, M.; Baker, B. J. & Kawauchi, H. 1991b. Cellular localization of somatolactin in the pars intermedia of teleost fishes. *Cell Tissue Res.* 263: 207-215.
- Reinecke, M. 2010. Influences of the environment on the endocrine and paracrine fish growth hormone-insulin-like growth factor-I system. *J. Fish. Biol.* 76: 1233-1254.
- Rocha, M. J. & Rocha, E. 2006. Morphofunctional aspects of reproduction from synchronous to asynchronous fishes – An overview. Pp: 570-624. In: Reinecke, M.; Zaccone, G. & Kappor, B. G. (Eds.). *Fish Endocrinology*. Science Publishers. vol. 2.
- Scharrer, E. 1932. Secretory cells in the midbrain of the European Minnow (*Phoxinus laevis* L.). *J. Comp. Neurol.* 55: 573-576.
- Schreiber, A. M. & Specker, J. L. 1999. Early larval development and metamorphosis in the summer flounder: changes in per cent whole-body water content and effects of altered thyroid status. *J. Fish Biol.* 55: 148-157.
- Schulz, R. W.; Bogerd, J.; Bosma, P. T.; Peute, J.; Rebers, F. E. M.; Zandbergen, M. A. & Goos, H. J. 1995. Physiological, morphological and molecular aspects of gonadotropins in fish with special reference to African catfish. Pp: 2-5. In: Goetz, F. W. & Thomas, P. (Eds.). *International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Austin. Proceedings. University of Austin, Austin.
- Schulz, R. W.; Bosma, P. T.; Zandbergen, M. A.; Van der Sanden, M. C. A.; Dijk, W. V.; Bogerd, J. & Goos, H. J. 1993. Two gonadotropin-releasing hormones in the African catfish, *Clarias gariepinus*: localization, pituitary, receptor binding and gonadotropin release activity. *Endocrinology* 133: 1569-1577.
- Schulz, R. W.; França, L. R.; Lareyre, J.; LeGac, F.; Chiarini-Garcia, H.; Nóbrega, R. H. & Miura, T. 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 390-411.
- Schwanzel-Fukuda, M. & Pfaff, D. W. 1990. The migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons from the medial olfactory placode into the medial basal forebrain. *Cell. Mol. Life Sci.* 46: 956-962.
- Seeburg, P. H.; Mason, A. J.; Stewart, T. A. & Nikolics, K. 1987. The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. *Recent Prog. Horm. Res.* 43: 69-98.

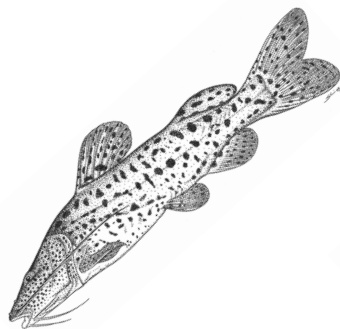
- Segura-Noguera, M. M.; Laiz-Carrión, R.; Martín del Río, M. P. & Mancera, J. M. 2000. An immunocytochemical study of the pituitary gland of the white seabream (*Diplodus sargus*). *Histochem. J.* 32: 733-742.
- Servili, A.; Lethimonier, C.; Lareyre, J.; López-Olmeda, J. F.; Sánchez-Vázquez, F. J.; Kah, O. & Muñoz-Cueto, J. A. 2010. The highly conserved gonadotropin-releasing hormone-2 form acts as a melatonin-releasing factor in the pineal of a teleost fish, the European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Neuroendocrinology* 151: 2265-2275.
- Sherwood, N. M. & Adams, B. A. 2005. Gonadotropin-releasing hormone in fish: evolution, expression and regulation of the GnRH gene. Pp: 1-39. In: Sherwood, N. & Melamed, P. (Eds.). *Hormones and their receptors in fish reproduction*. Mol. Aspec. Fish Mar. Biol.
- Somoza, G. M.; Lescheid, D. W.; Miranda, L. A.; Lo Nostro, F. L.; Magliulo-Cepriano, L.; Montaner, A. D.; Schreiberman, M. P.; Rivier, J. E. & Sherwood, N. M. 2002b. Expression of pejerrey gonadotropin-releasing hormone in three Orders of fish. *Biol. Reprod.* 67: 1864-1871.
- Somoza, G. M.; Miranda, L. A.; Strobl-Mazzulla, P. & Guilgur, L. G. 2002a. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): from fish to mammalian brains. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22: 589-609.
- Somoza, G. M.; Stéfano, A.; D'Eramo, J. L.; Canosa, L. F. & Fridman, O. 1994. Immunoreactive GnRH suggesting a third form of GnRH in addition to cIIGnRH and sGnRH in the brain and pituitary gland of *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Gen. Comp. Endocrinol.* 94: 44-52.
- Sower, S. A.; Chiang, Y.; Lovas, S. & Conlon, M. 1993. Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *Endocrinology* 132: 1125-1131.
- Sower, S. A.; Freamat, M. & Kavanaugh, S. I. 2009. The origins of the vertebrate hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) and hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) endocrine systems: new insights from lampreys. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161: 20-29.
- Stevenson, T. J.; Arckens, L. & MacDougall-Shackleton, S. A. 2007. Distribution of gonadotropin-releasing hormone-II in the house sparrow brain (*Passer domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 150: 96-105.
- Takei, Y. & Loretz, C. A. 2006. *Endocrinology*. Pp: 271-318. In: Evans, D. H. & Claiborne, J. B. (Eds.). *The Physiology of Fish*. 3ed. Taylor & Francis Group.

- Taranger, G. L.; Carrillo, M.; Schulz, R. W.; Fontaine, P.; Zanuy, S.; Felip, A.; Weltzien, F.; Dufour, S.; Karlsen, Ø.; Norberg, B.; Andersson, E. & Hansen, T. 2010. Control of puberty in farmed fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 483-515.
- Trudeau, V. L. 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev. Reprod.* 2: 55-68.
- Trudeau, V. L. 2006. Comparative neuroendocrinology: integration of hormonal and environmental signals in vertebrates and invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 144A: 243-246.
- Trudeau, V. L.; Sloley, B. D.; Wong, A. O. & Peter, R. E. 1993. Interactions of gonadal steroids with brain dopamine and gonadotropin-releasing hormone in the control of gonadotropin-II secretion in the goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89: 39-50.
- Tsai, P. & Licht, P. 1993. Differential distribution of chicken-I and chicken-II GnRH in the turtle brain. *Peptides* 14: 221-226.
- Tsai, P. S. 2006. Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: structure, function and evolution. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148: 48-53.
- Tsutsui, K. & Osugi, T. 2009. Evolutionary origin and divergence of GnIH and its homologous peptides. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161: 30-33.
- Tsutsui, K.; Bentley, G. E.; Ubuka, T.; Saigoh, E.; Yin, H.; Osugi, T.; Inoue, K.; Chowdhury, V. S.; Ukena, K.; Ciccone, N.; Sharp, P. J. & Wingfield, J. C. 2007. The general and comparative biology of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). *Gen. Comp. Endocrinol.* 153: 365-370.
- Ueda, H. 2010. Physiological mechanism of homing migration in Pacific salmon from behavioral to molecular biological approaches. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170: 222-232.
- Vazzoler, A. E. A. M. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.* EDUEM, Maringá. 169p.
- Venkatesh, B. 2003. Evolution and diversity of fish genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13: 588-592.
- Vissio, P. G.; Somoza, G. M.; Maggese, M. C.; Paz, D. A. & Strüssmann, C. A. 1997. Structure and cell type distribution in the pituitary gland of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Fish. Sci.* 63(1): 64-68.
- Weltzien, F. A.; Andersson, E.; Andersen, Ø.; Shalchian-Tabrizi, K. & Norberg, B. 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comp. Biochem. Physiol.* 137A: 447-277.

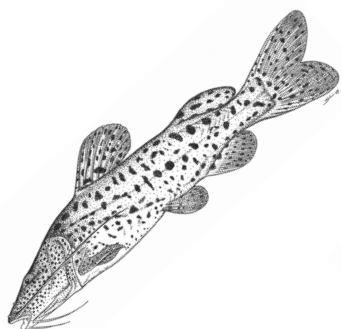
- White, R. B.; Eisen, J. A.; Kasten, T. L. & Fernald, R. D. 1998. Second gene for gonadotropin releasing hormone in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 305-309.
- Whitlock, K. E.; Illing, N.; Brideau, N. J.; Smith, K. M. & Twomey, S. 2006. Development of GnRH cells: setting the stage for puberty. *Mol. Cell. Endocrinol.* 254-255: 39-50.
- Withers, P. C. 1992. *Comparative animal physiology.* Saunders College Publishing. 949p.
- Wootton, R. J. 1990. *Ecology of teleost fishes.* London – New York. Chapman and Hall. 404p.
- Yaron, A.; Gur, G.; Melamed, P.; Rosenfeld, H.; Levavi-Sivan, B. & Elizur, A. 2001. Regulation of gonadotropin subunit genes in tilapia. *Comp. Biochem. Physiol.* 129B: 489-502.
- Yoo, M. S.; Kang, H. M.; Choi, H. S.; Kim, J. W.; Troskie, B. E.; Millar, R. P. & Kwon, H. B. 2000. Molecular cloning, distribution and pharmacological characterization of a novel gonadotropin-releasing hormone ([Trp8]GnRH) in frog brain. *Mol. Cell. Endocrinol.* 164: 197-204.
- Zandbergen, M. A.; Kah, O.; Bogerd, J.; Peute, J. & Goos, H. J. 1995. Expression and distribution of two gonadotropin-releasing hormone in the catfish brain. *Neuroendocrinology* 62: 571-578.
- Zavala-Camin, L. A. 2004. *O planeta água e seus peixes.* Edição do Autor. 326p.
- Zhang, L.; Tello, J. A.; Zhang, W. & Tsai, P. 2008. Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a gonadotropin-releasing hormone-like molecule in the gastropod mollusk, *Aplisia californica*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156: 201-209.
- Zmora, N.; Kazeto, Y.; Kumar, R. S.; Schulz, R. W. & Trant, J. M. 2007. Production of recombinant channel catfish (*Ictalurus punctatus*) FSH and LH in S2 Drosophila cell line and an indication of their different actions. *J. Endocrinol.* 194: 407-416.
- Zohar, Y. & Mylonas, C. C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99-136.
- Zohar, Y.; Muñoz-Cueto, J.; Elizur, A. & Kah, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 438-455.







## TABELAS: CAPÍTULO 1





**Tabela 1.** Estrutura das 25 diferentes formas moleculares conhecidas do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH). Os aminoácidos grifados em azul são as diferentes formas moleculares de GnRH se comparado com o GnRH de mamíferos. As variantes de GnRH grifadas em cinza, tem sido identificadas em peixes. Fonte: adaptado de Iwakoshi et al. (2002), Sherwood & Adams, (2005) e Guilgur et al. (2006).

Animal	Aminoácidos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Mammalian	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Whitefish	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	<b>Met</b>	<b>Asn</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Salmon	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	<b>Trp</b>	<b>Leu</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Sea Bream	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	<b>Ser</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Pejerrey	pGlu	His	Trp	Ser	<b>Phe</b>	Gly	Leu	<b>Ser</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Herring	pGlu	His	Trp	Ser	<b>His</b>	Gly	Leu	<b>Ser</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Catfish	pGlu	His	Trp	Ser	<b>His</b>	Gly	Leu	<b>Asn</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Dogfish	pGlu	His	Trp	Ser	<b>His</b>	Gly	<b>Trp</b>	<b>Leu</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Chicken-II	pGlu	His	Trp	Ser	<b>His</b>	Gly	<b>Trp</b>	<b>Tyr</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Lamprey-III	pGlu	His	Trp	Ser	<b>His</b>	<b>Asp</b>	<b>Trp</b>	<b>Lys</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Lamprey-I	pGlu	His	<b>Tyr</b>	Ser	<b>Leu</b>	<b>Glu</b>	<b>Trp</b>	<b>Lys</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Guinea Pig	pGlu	<b>Tyr</b>	Trp	Ser	Tyr	Gly	<b>Val</b>	Arg	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Chicken-I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	<b>Gln</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Frog	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	<b>Trp</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Tunicate-1	pGlu	His	Trp	Ser	<b>Asp</b>	<b>Tyr</b>	<b>Phe</b>	<b>Lys</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Tunicate-2	pGlu	His	Trp	Ser	<b>Leu</b>	<b>Cyr</b>	<b>His</b>	<b>Ala</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Tunicate-3	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	<b>Glu</b>	<b>Phe</b>	<b>Met</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Tunicate-4	pGlu	His	Trp	Ser	<b>Asn</b>	<b>Gln</b>	<b>Leu</b>	<b>Thr</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Tunicate-5	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	<b>Glu</b>	<b>Tyr</b>	<b>Met</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Tunicate-6	pGlu	His	Trp	Ser	<b>Lys</b>	Gly	<b>Tyr</b>	<b>Ser</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Tunicate-7	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	<b>Ala</b>	<b>Leu</b>	<b>Ser</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Tunicate-8	pGlu	His	Trp	Ser	<b>Leu</b>	<b>Ala</b>	<b>Leu</b>	<b>Ser</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
Tunicate-9	pGlu	His	Trp	Ser	<b>Asn</b>	<b>Lys</b>	<b>Leu</b>	<b>Ala</b>	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Octopus vulgaris</i>	pGlu	Asn	Tyr	His	Phe	Ser	Asn	Gly	Trp	His	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>
<i>Aplysia californica</i>	pGlu	Asn	Tyr	His	Phe	Ser	Asn	Gly	Trp	Tyr	Ala	Gly-NH <sub>2</sub>

Asp: ácido aspártico; Glu: ácido glutâmico; Arg: arginina; Lys: lisina; His: histidina; Asn: asparagina; Gln: glutamina; Ser: serina; Thr: treonina; Tyr: tirosina; Ala: alanina; Gly: glisina; Val: valina; Leu; leucina; Ile: isoleucina; Pro: prolina; Phe: fenilalanina; Met: metionina; Trp: triptofano; Cys: cisteína.

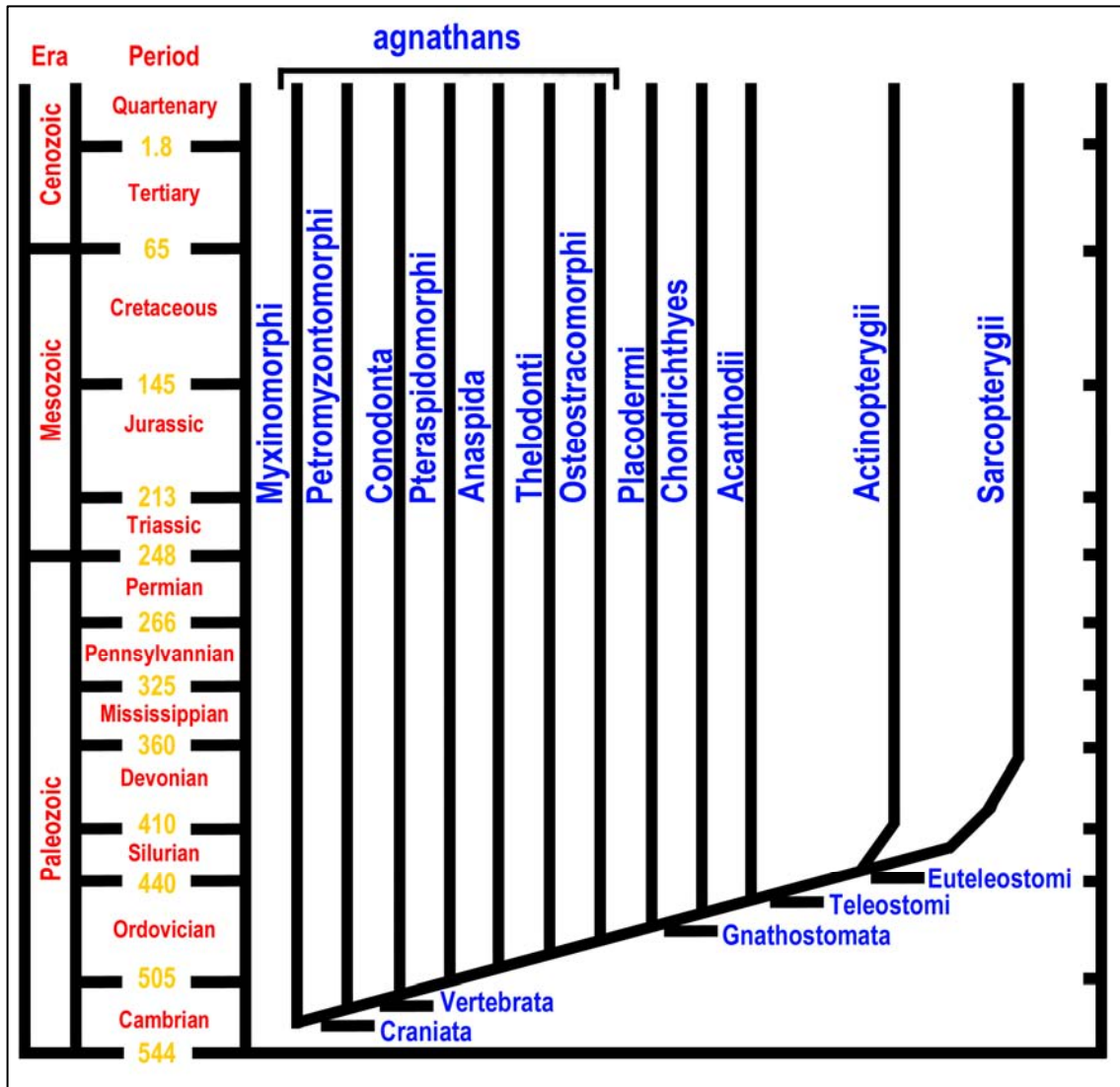




**FIGURAS: CAPÍTULO 1**



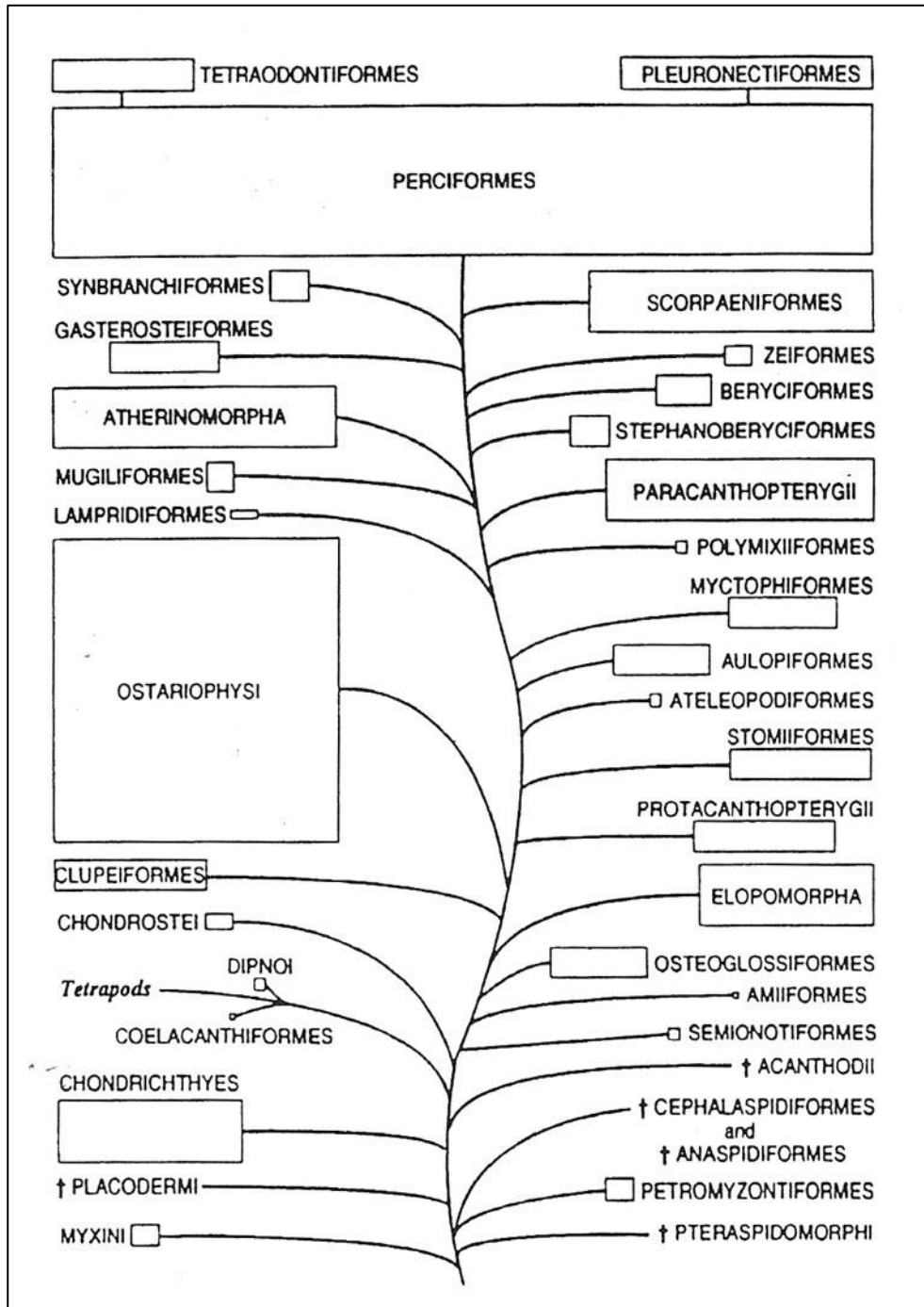




**Fig. 1.** Representação esquemática de uma especulativa visão do tempo de divergência dos maiores grupos de peixes. O tempo aproximado é de milhões de anos. Fonte: retirado e adaptado de Nelson (2006).

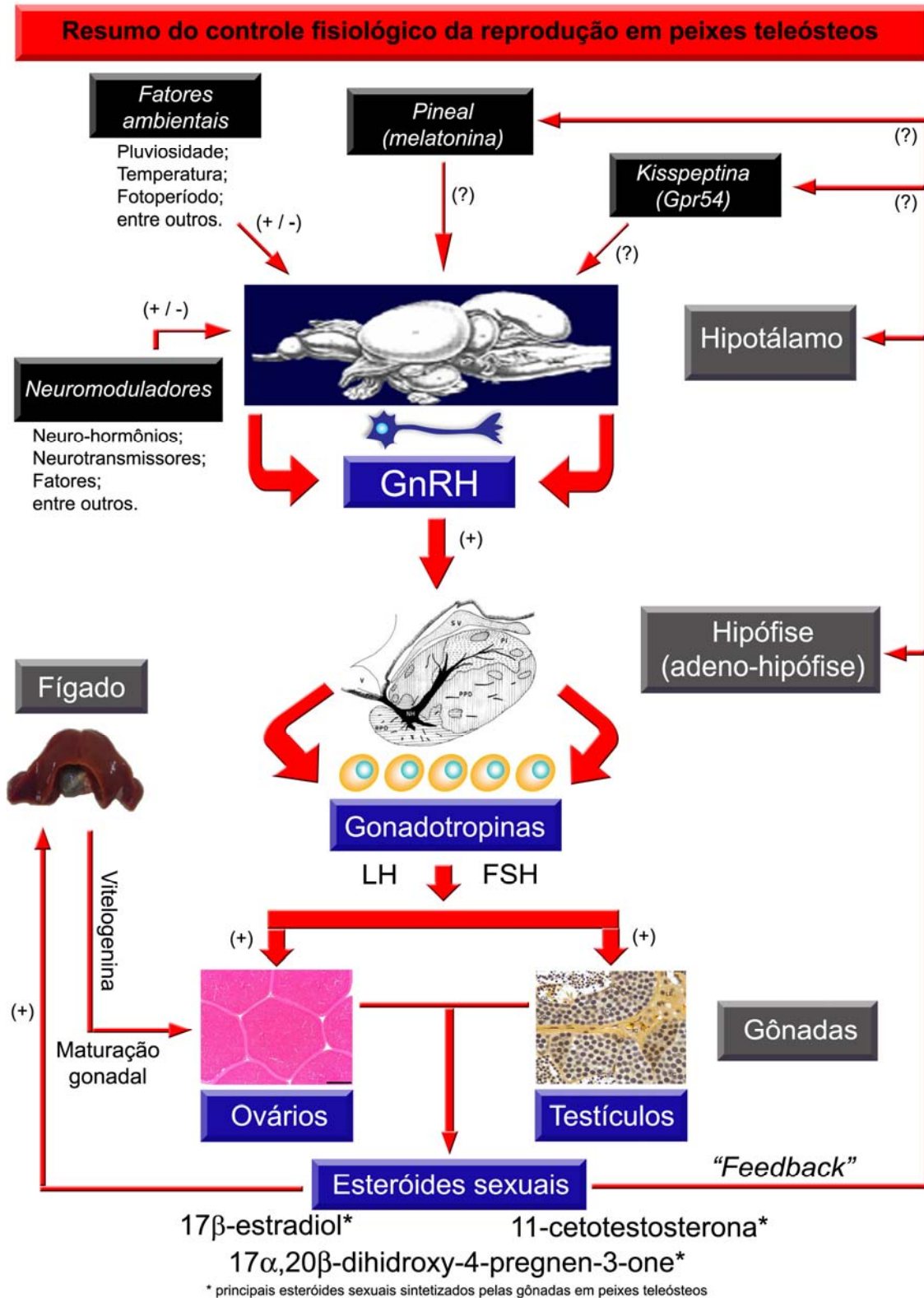






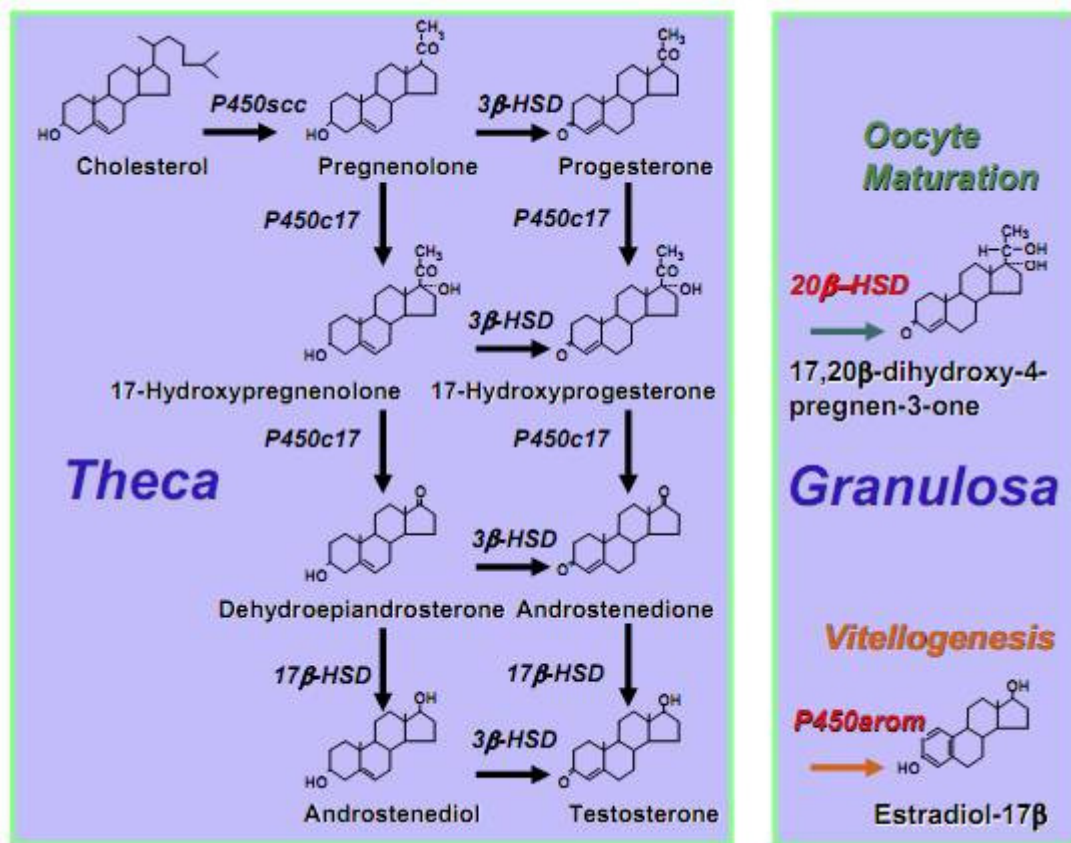
**Fig. 2.** Representação esquemática de um diagrama de relação dos maiores grupos estendido de peixes, apresentando cada bloco, um número representativo da quantidade de espécies em cada ordem. A partir do grupo “Chondrostei” até os grupos “Tetraodontiformes” e “Pleuronectiformes” são os chamados *Actinopterygii*. O grupo “Teleostei” (teleósteos) inclui todos os peixes a partir de “Osteoglossiformes” até os grupos mais derivados “Tetraodontiformes” e “Pleuronectiformes”. Fonte: retirado e adaptado de Nelson (1994).





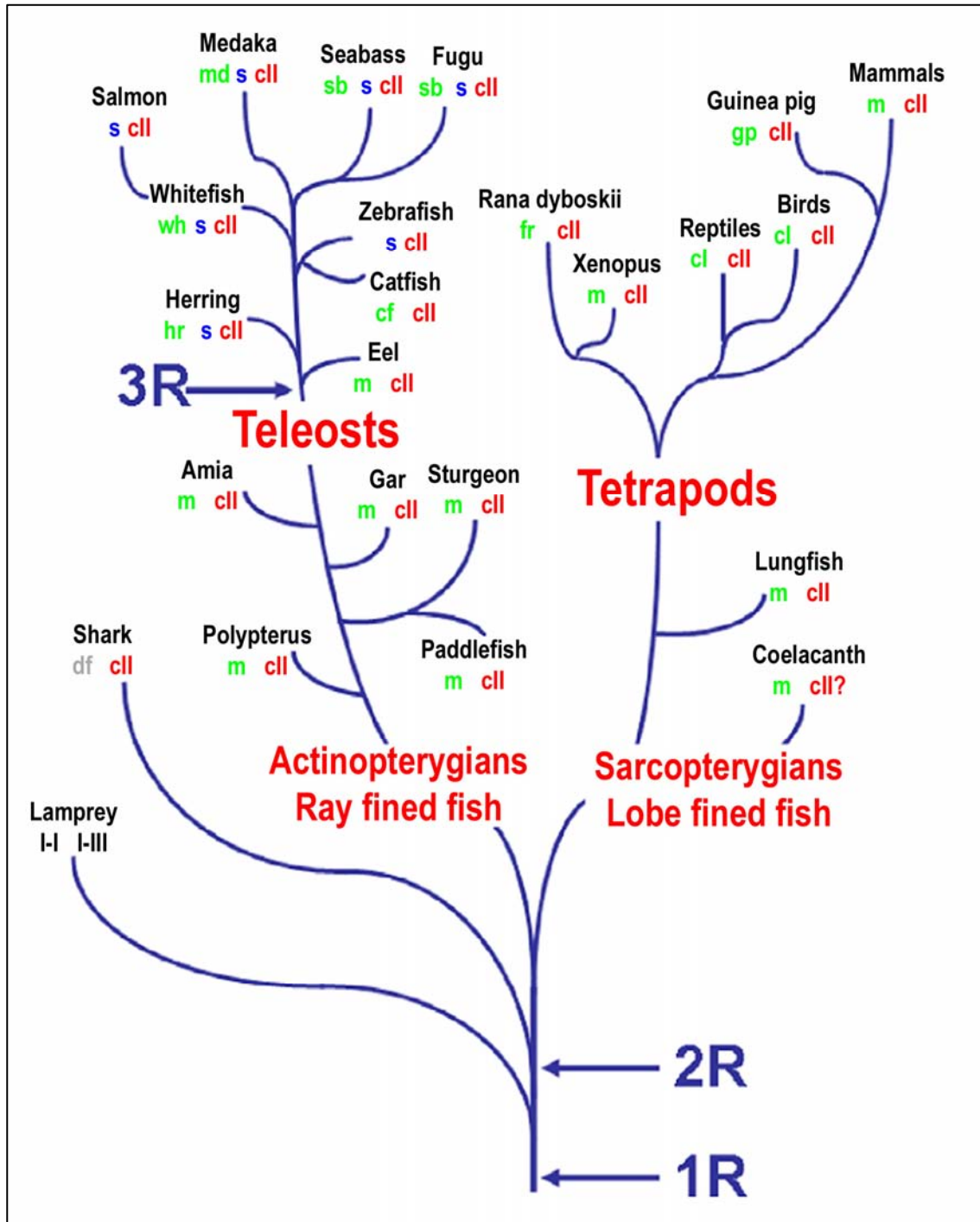
**Fig. 3.** Representação esquemática dos principais fatores relacionados com o controle neuroendócrino da reprodução em peixes teleósteos (explicações no decorrer do texto).  
Imagens: Renato Massaaki Honji, Rafael Henrique Nóbrega, Maura Valim Val-Sella e Leonardo Gastón Guilgur.





**Fig. 4.** Representação esquemática da interação das camadas foliculares (granulosa e teca) na síntese dos esteróides sexuais durante a maturação oocitária e vitelogênese. Enzimas: P450scc, P450 *side-chain cleavage*; P450c17, *17-hydroxylase/C17-C20-lyase*; 3β-HSD, *3β-hydroxysteroid dehydrogenase*; 17β-HSD, *17β-hydroxysteroid dehydrogenase*; 20β-HSD, *20β-hydroxysteroid dehydrogenase*; P450arom, *P450 aromatase*. Fonte: retirado e adaptado de Lubzens et al. (2010).

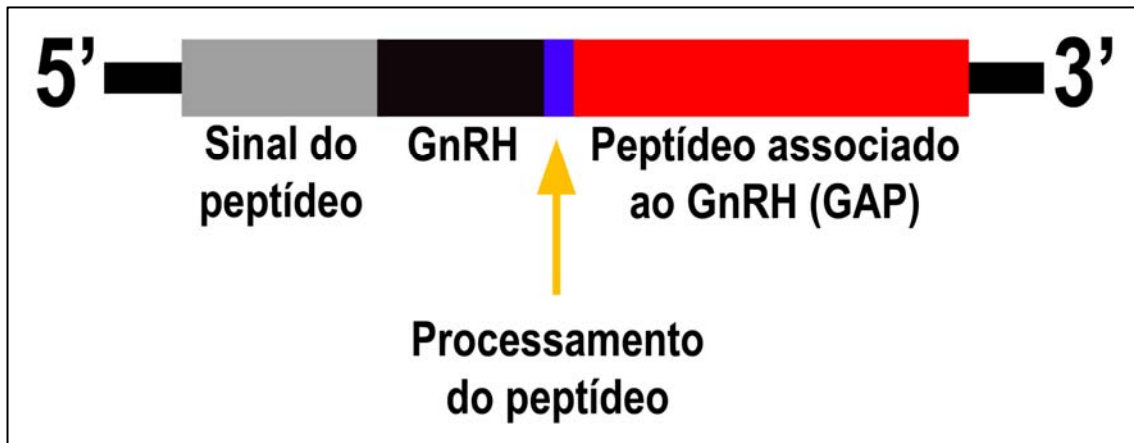




**Fig. 5.** Distribuição das diferentes variantes de GnRH em vertebrados. cI, *chicken* (cGnRH-I); cII, *chicken* (cGnRH-II); cf, *catfish* (cfGnRH); df, *dogfish* (dfGnRH); fr, *frog* (frGnRH); gp, *guinea pig* (gpGnRH); hr, *herring* (hrGnRH); I-I, *lamprey* (lGnRH-I); I-III, *lamprey* (lGnRH-III); m, *mammalian* (mGnRH); md, *medaka* (mdGnRH) (ou *pejerrey*, pjGnRH); s, *salmon* (sGnRH); sb, *seabream* (sbGnRH); wh, *whitefish* (whGnRH). 1R, 2R e 3R: possíveis

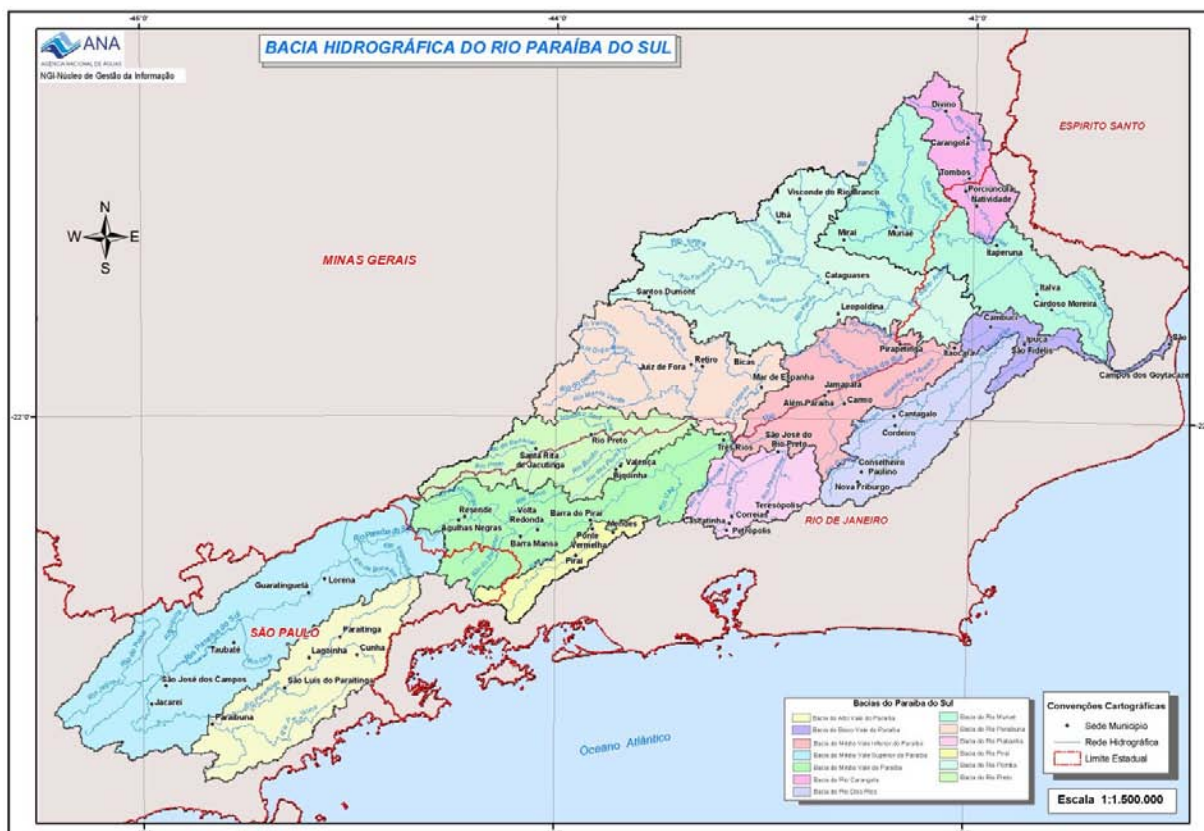
“rounds” de duplicação de genoma. Explicações no decorrer do texto. Fonte: retirado e adaptado de Kah et al. (2007).





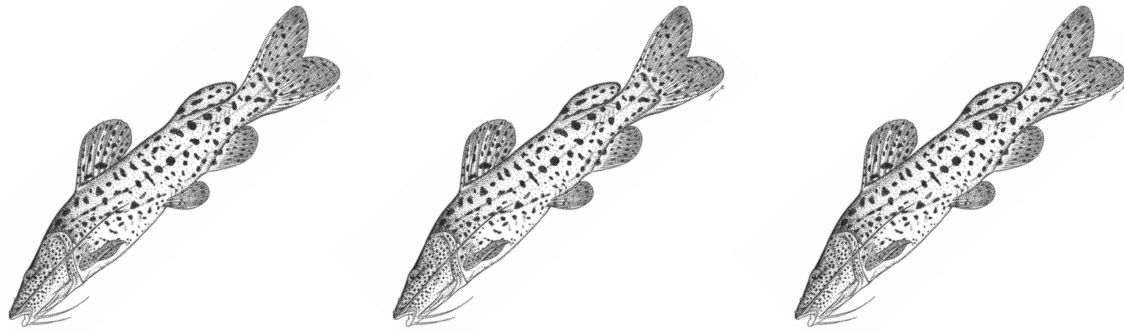
**Fig. 6.** Representação esquemática de todos os genes que codificam o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH). Todos os GnRHs possuem a mesma organização estrutural das diferentes variações moleculares, apresentando um peptídeo sinal (cinza), o decapeptídeo GnRH (preto), um sítio de clivagem proteolítica (azul) e um peptídeo associado ao GnRH (GAP). Fonte: retirado e adaptado de González-Martínez et al. (2001) e Guilgur (2008).



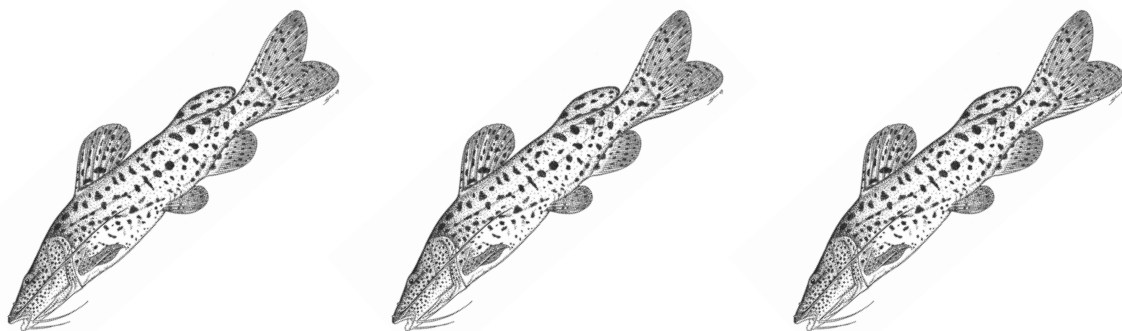


**Fig. 7.** Bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul. *Steindachneridion parahybae* é endêmico desta Bacia. Fonte: disponível em <http://www.agevap.org.br>





## **ANEXO – 1: CAPÍTULO 1**



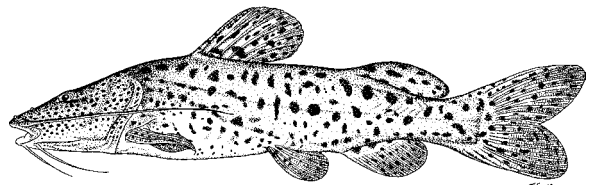


## Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae)

Renato M. Honji · Danilo Caneppele ·  
Alexandre W. S. Hilsdorf · Renata G. Moreira

Received: 15 July 2008 / Accepted: 31 March 2009 / Published online: 28 April 2009  
© Springer Science + Business Media B.V. 2009

**Common name:** Surubim do Paraíba. **Conservation status:** Critically endangered in Brazilian Red List (Rosa and Lima 2005), and regionally extinct in São Paulo State (São Paulo 2008). *Steindachneridion parahybae* is a migratory freshwater species and critically endangered in Paraíba do Sul River Basin. **Identification:** maxillary barbel short, reaching or surpassing origin of pectoral-fin insertion; pectoral and adipose fins short; pelvic fin very short, never reaching anus. Ground color in alcohol light grayish, abdomen whitish, large dark brown blotches irregularly distributed over head and trunk in an irregular, vermiculated or dotted pattern (Garavello 2005). **Distribution:** Endemic to the Paraíba do Sul River Basin (Garavello 2005). **Abundance:** In the 1950 s



there were some records of capture of this specie of around 1,000 kg/year just in the part of the basin (Machado and Abreu 1952) and nowadays there are no capture records in the São Paulo State (São Paulo 2008). **Habitat and ecology:** Freshwater benthopelagic species, prefers bottoms with sand and stones; mainly carnivorous (Moraes and Caramaschi 1993). **Reproduction:** *S. parahybae* is a migratory species ascending the rivers to reproduce during summer. **Threats:** (1) Construction of dams in the Paraíba do Sul River which block the reproductive migration and act as a barrier to dispersal; (2) riparian habitat destruction; (3) water pollution, due to the high industrial development of the region; and (4) fishing. **Conservation action:** Since 2003, the Hydrobiology and Aquaculture Unit of CESP (Paraibuna/SP), has been supporting a fish restocking program (Caneppele et al. 2004) and fisheries efforts, funded by a governmental program (ANEEL 2006) will be important to estimate the occurrence and genetic evaluation of the specie. **Conservation recommendation:** Establish habitat protection and monitoring riparian zone;

---

R. M. Honji · R. G. Moreira (✉)  
Institute of Biosciences, University of São Paulo,  
Rua do Matão, Trav. 14, 321,  
05508-900 São Paulo, SP, Brazil  
e-mail: renatagm@ib.usp.br

D. Caneppele  
Hydrobiology and Aquaculture Unit of the Energetic  
Company of São Paulo State (CESP),  
Rodovia dos Tamoios, km 38,  
12260-000 Paraibuna, SP, Brazil

A. W. S. Hilsdorf  
University of Mogi das Cruzes,  
Av. Dr. Cândido X. A. Souza, 200,  
08780-911 Mogi das Cruzes, SP, Brazil

avoid new dams construction and stimulate studies on *S. parahybae* biology, to support the artificial reproduction program, done nowadays only on empirical basis.

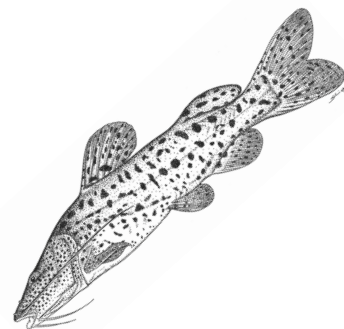
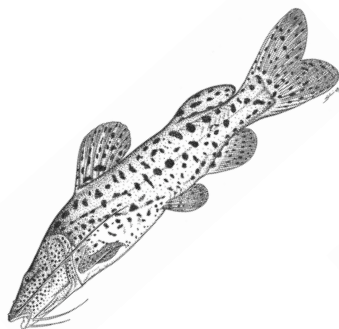
## References

- ANEEL. 2006. Formação de um Banco de Germoplasma da Ictiofauna Ameaçada da Bacia do Rio Paraíba do Sul. ANEEL (0061-017/2006)
- Caneppele D, Oliveira JAC, Rosa MM, Barros BPP (2004) Tecnologia de Reprodução Induzida Aplicada à Preservação do Surubim do Paraíba. XIII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, SIMBRAq, Fortaleza, Brasil, pp 287
- Garavello JC (2005) Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotrop Ichthyol* 3(4):607–623
- Machado CE, Abreu HCF (1952) Notas preliminaries sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo. A pesca no Vale do Paraíba. *Bol Ind Animal* 13:145–160
- Moraes DF Jr, Caramaschi EP (1993) Levantamento da ictiofauna do Rio Paraíba do Sul e ciclo reprodutivo das principais espécies, no trecho a jusante de Três Rios. X EBI. Resumos
- Rosa RS, Lima FCT (2005) Peixes. In: Machado AB, Martins CS, Drummond GM (eds) Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Biodiversitas, Belo Horizonte
- São Paulo (2008) Decreto Estadual no 53494-2008 de 02 de outubro de 2008. Diário Oficial do Estado de São Paulo 118(187). Secretaria do Meio Ambiente





## ANEXO – 2: CAPÍTULO 1





## Scientific Note

### Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae)

Danilo Caneppele<sup>1</sup>, Renato M. Honji<sup>2</sup>, Alexandre W. S. Hilsdorf<sup>3</sup> and Renata G. Moreira<sup>2</sup>

The “surubim do Paraíba” (*Steindachneridion parahybae*) is a freshwater catfish endemic to the Paraíba do Sul River basin, Brazil. This species has been seriously threatened by environmental disturbances in the last several decades. Wild *Steindachneridion parahybae* males and females were collected in 2003 and taken to the hatchery of a power plant of the Companhia Energética de São Paulo (CESP). *Steindachneridion parahybae* broodstocks were artificially induced to reproduce in December 2003 using a combination of carp pituitary extract (CPE) and human chorionic gonadotropin (hCG). Oocytes and milt were stripped; the fertilized eggs were transferred to 60-liter conical incubators and hatched larvae distributed in nine horizontal trays. Exogenous feed was started just after yolk sac absorption. A high rate of cannibalism and photophobia were observed during the larval period, resulting in a 26% survival rate from larvae to fingerlings.

O “surubim do Paraíba” (*Steindachneridion parahybae*) é um bagre de água doce, endêmico da bacia do rio Paraíba do Sul, Brasil. Esta espécie foi seriamente ameaçada por distúrbios ambientais nas últimas décadas. Machos e fêmeas selvagens de *Steindachneridion parahybae* foram coletados em 2003 e transferidos para a piscicultura da CESP (Companhia Energética de São Paulo). Reprodutores de *S. parahybae* foram induzidos à reprodução artificial em dezembro de 2003 usando uma combinação de extrato hipofisário de carpa (CPE) e gonadotropina coriônica humana (hCG). Após a extrusão dos óvulos e do sêmen, os ovos fertilizados foram transferidos para incubadoras cônicas de 60 litros e, em seguida, as larvas eclodidas distribuídas em nove incubadoras horizontais. Após a absorção do saco vitelino, a alimentação exógena foi iniciada. Uma alta taxa de canibalismo e fotofobia foram observados durante o período larval, resultando em uma taxa de sobrevivência de 26% de larvas para os alevinos.

**Key words:** Surubim do Paraíba, Paraíba do Sul River, Artificial reproduction.

The “surubim do Paraíba” (*Steindachneridion parahybae*) (Fig. 1) is a medium-sized siluriform freshwater species, endemic to the Paraíba do Sul River basin (Oliveira & Moraes Jr., 1997; Garavello, 2005). This basin is an isolated hydrographic basin located in southeast Brazil (20°26' and 23°39'S, and 41° and 46°30'W), and *S. parahybae* was commonly captured in the commercial fisheries along the Paraíba do Sul River during the 1950's (Machado & Abreu, 1952).

The surubim do Paraíba species is critically threatened (Brasil, 2004; Caneppele *et al.*, 2008; São Paulo, 2008; Honji *et*

*al.*, 2009), and presently, there are no records of this species in the southern rivers of the Paraíba do Sul basin (São Paulo, 2008). A few populations still remain in northern tributaries, but their survival faces constant threats from pollution, river damming, sand extraction from riverbeds and floodplains, predatory fishing, and the introduction of exotic fish species (Hilsdorf & Petrele, 2002). The biological information that is available about the surubim do Paraíba is very scarce. Its spawning season occurs from late November until March, and its feeding habit is mainly carnivorous (ichthyophagous). Their

<sup>1</sup>CESP - Companhia Energética de São Paulo, Unidade de Hidrobiologia e Aqüicultura. Rodovia dos Tamoios, km 38, 12260-000 Paraibuna, SP, Brazil. danilo.caneppele@cesp.com.br

<sup>2</sup>Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Rua do Matão, Travessa 14, 321, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. honjijp@usp.br (RMH), renatagm@ib.usp.br (RGM)

<sup>3</sup>Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes. Caixa Postal 411, 08701-970 Mogi das Cruzes, SP, Brazil. wagner@umc.br

endangered status (Rosa & Lima, 2005) makes any biological study of surubim do Paraíba extremely laborious, especially during sample collection stages. Therefore, the present difficulty of capturing the species may contribute to the paucity of information about this species, which is at risk of becoming extinct without being fully described.

In the past five years, this species has been included in the conservation program undertaken by the Companhia Energética de São Paulo (CESP, 2006). The first goal of the program was to develop an artificial reproduction protocol that would be applied to *S. parahybae* fingerling production. The objective of this study was to present the results of the first reported artificial spawning of *S. parahybae*.

Information from local artisanal fishermen made it possible for us to locate a population that still survives in a small tributary of the Paraíba do Sul River. During 2003, fifteen individuals were caught in the Paraíba do Sul River, near the town of Rio das Flores in the state of Rio de Janeiro (22°13'54"S 43°25'15"W), and brought to the CESP hatchery in order to start the first trials of induced hormonal reproduction. The broodstock (100% survival) were maintained in 200 m<sup>2</sup> ponds and fed commercial food (40% crude protein, Purina TC 40).

In December 2003, the animals were selected according to the typical morphological characteristics of sexual maturity (Leonardo *et al.*, 2004), and based on these characteristics, two females and two males were chosen for artificial reproduction. The females were selected by external characteristics according to the hyperemic genital pore (and swollen abdomen), and the males were chosen according to the white color and high fluidity of milt when the abdominal region was squeezed. The selected broodstock were transferred to the laboratory and kept in 1,000 liter tanks.

The animals were induced to reproduce by combining whole acetone-dried carp pituitary extract (CPE) (Fish Braz) with a protocol proposed by von Ihering & Azevedo (1934, 1936) but using CPE (as proposed for the pimelodid *Pseudoplatystoma fasciatum*, by Leonardo *et al.*, 2004) and human chorionic gonadotropin (hCG) (Pregnyl - Organon), was performed as follows. Two CPE doses (0.6 mg and 5.4 mg CPE per kg of fish body weight, dissolved in 0.9% sodium chloride solution, considering 0.6 ml in each dose) were used for females, with a 12 h interval between the CPE doses. For males, a single dose was applied at the same time as the females' second dose; this dose contained 3 mg CPE per kg

and was also diluted in 0.9% sodium chloride solution. A single dose of hCG was given at the same time as the second CPE application. The hCG concentration used was 2 IU per kg for females and 1 IU per kg for males (Harvey & Carolsfeld, 1993). A summary of the doses used in this protocol is shown in Table 1.

**Table 1.** Protocol of *Steindachneridion parahybae* induced reproduction

Animal	Weight (g)	hCG (IU/kg)	First CPE dose (mg/kg)	Second CPE dose (mg/kg)	Eggs spawned weight (g)
Female 1	2400	2	0.6	5.4	66
Female 2	1300	2	0.6	5.4	40
Male 1	1800	1		3.0	
Male 2	1100	1		3.0	

The use of hCG combined with pituitary extracts has been used in fish species (Thalathiah *et al.*, 1988; Kucharczyk *et al.*, 1997; Zohar & Mylonas, 2001; Leonardo *et al.*, 2004) and has proven to be a very successful and consistent strategy in catfish species (Thalathiah *et al.*, 1988).

After hormone administration, each couple was placed in a 1,000 liter glass tank to facilitate the observation of their sexual behavior during spawning. The time necessary for gamete elimination, counted from the second hormone administration until spawning, was calculated as accumulated thermal units (ATU), or degree-hours. Therefore, the ATU is the sum of the water temperature per hour, from the second hormonal application until spawning (Weingartner & Filho, 2005). After 200 ATUs (average temperature of 24°C), it was possible to observe an increase in the animals' activity, including aggressive behavior that could harm the partner. This behavior was important to determine when to separate males and females and to strip their gametes in plastic containers. Fertilization was performed by gentle mixing using the "dry" method (von Ihering & Azevedo, 1936). Spawning occurred between 240 and 255 ATU. The ATU value for *S. parahybae* was similar to other siluriform species, such as *Rhamdia quelen*, where the ATU value was 220 - 240 at 22-27°C (Baldiasserotto & Neto, 2005), *Pseudoplatystoma corruscans* (200 - 280 ATU at 28°C) (Campos, 2005) and *Steindachneridion melanoderdatum* (240 - 280 ATU at 27°C) (Ludwig *et al.*, 2005).

The estimated number of ovules in *S. parahybae* was 324 ovules per gram of ovulated ovary mass (calculated by weighing the ovulated eggs and counting subsamples in triplicate). Considering the body weight of both females (Table 1), we can conclude that the number of released ovules ranged from 9,000 to 10,000 eggs kg<sup>-1</sup> of female body weight. This value is lower than the number found in *R. quelen*, in which each kilogram of female body weight corresponds to approximately 216,000 eggs (Baldiasserotto & Neto, 2005). Higher numbers of eggs are also found in *P. corruscans*, which produces between 135,000 and 220,000 eggs kg<sup>-1</sup> of female body weight (Campos, 2005), and consequently, *S. parahybae*



**Fig. 1.** *Steindachneridion parahybae*, Paraíba do Sul River basin, Paraíba, São Paulo State, Brazil. Lateral view (image by Caneppele).

releases a smaller mass of eggs (27 - 30 g kg<sup>-1</sup>, calculated from Table 1) than does *P. corruscans*. During the 2007-2008 spawning season, after the beginning of physiological studies on the pituitary-gonad axis of *S. parahybae*, two females were also stripped using the same protocol described here for hormonal induction, and the amount of eggs released increased to about 45 g kg<sup>-1</sup> (data not shown).

After spawning and hydration, the eggs were gently transferred from the plastic containers to the 60-liter conical incubators (built at CESP) (Table 1). In general, *S. parahybae* eggs were floating, yellowish, measuring ca. 190 µm. After an incubation of 42 h at an average temperature of 24°C, approximately 29,200 hatched larvae from both females were divided among nine horizontal trays (built at CESP; 180 x 40 x 8 cm) (3,200 larvae per tray), where they were maintained for 8 days. The yolk reserve was completely absorbed within the first 24 h, *i.e.*, one day after hatching (DAH). The congeneric species *S. melanodermatum* showed a shorter egg incubation period, 18 h, but a longer yolk absorption period, 48 h, at 27°C (Ludwig *et al.*, 2005).

The first feeding started on the 2<sup>nd</sup> DAH; cannibalism was observed during larval development, as was heterogeneous larval growth and photophobia. Cannibalism has already been observed in many siluriform species (Luz *et al.*, 2001; Baldissarotto & Neto, 2005; Campos, 2005; Ludwig *et al.*, 2005; Schutz *et al.*, 2008) and is one of the main bottlenecks responsible for reducing larval survival. Reducing the amount of cannibalism during this phase of fingerling production will require specific attention. Different photoperiods were proposed to reduce cannibalism in *Steindachneridion scriptum*. Schutz *et al.* (2008) suggested a photoperiod of 14 h of light per day to be the best to achieve a higher survival with good growth. Photoperiod studies with the same species suggest that *S. scriptum* can easily acclimate to the light, displaying higher growth during the photoperiod with continuous light when compared with darkness (Zaniboni-Filho *et al.*, 2008).

During the incubation period - from the absorption of the yolk sac to the 3<sup>rd</sup> DAH - larvae were fed a combination (in the same proportion) of *Astyanax* spp. larvae and *Daphnia* spp. For *S. scriptum* larvae, the best growth rate was achieved using fish larvae (*Prochilodus lineatus*) as initial feeding (Schutz *et al.*, 2008). Beginning on the 4<sup>th</sup> DAH, all larvae were fed a commercial powdered diet containing 55% crude protein (CP), mixed with fish meal in a proportion of 4:1 (commercial diet: fish meal). The larvae accepted the artificial diet, and this transition was considered successful as previously suggested for *S. scriptum* larvae, in which feed transition was implemented between the second and eighth days of cultivation (Adamante *et al.*, 2007).

On the 8<sup>th</sup> DAH, larvae measuring 1.2 cm were transferred to two 200 m<sup>3</sup> earthen ponds provided with partial shade. The same feeding protocol was maintained (commercial powdered diet) to feed the larvae from the 4<sup>th</sup> DAH in the laboratory trays to approximately 30 days after hatching in the ponds. Animals were maintained for a further five months in the fish

ponds with commercial extruded diet with a pellet size of 26 mm and 45% CP. After five months, there were 7,800 surviving fingerlings, each measuring around 12 cm and weighing 23 g, yielding an estimated 26% rate of survival from the larval to fingerling phase.

This first trial of induced reproduction in *S. parahybae* is an important step towards understanding the reproductive biology of this endangered species, as well as contributing to its conservation. Captive breeding followed by introduction of captive-bred fish into the environment are techniques used widely to recover endangered fish species (Philippart, 1995; Brannon *et al.*, 2004). The production of *S. parahybae* fingerlings in captivity on a regular basis will allow the establishment of a more effective re-introduction program, as well as an investigation of its potential for fish farming. The protocol reported is viable for induced spawning in *S. parahybae*, but other hormones and doses should be investigated. Nevertheless, some basic aspects of the reproductive biology of *S. parahybae* remain unknown, such as the annual gonad histomorphology, which are important factors for establishing an accurate ovarian development cycle and determining the best month for artificial reproduction. Additionally, the annual variation of the gonadosomatic index and relative fecundity, which is important for predicting egg masses and amounts during spawning, has to be investigated.

### Acknowledgements

The authors would like to thank the local fishermen who helped us find and collect broodstock, as well as FAPESP (07/55494-7) for the financial support. The authors also wish to recognize the contribution made by the CESP staff, Benedito P. P. Barros and Milton M. Rosa.

### Literature Cited

- Adamante, W. B., M. Weingartner & A. P. O. Nuñez. 2007. Feed transition in larval rearing of bocudo, *Steindachneridion scriptum* (Pisces, Pimelodidae), using *Artemia* spp. *nauplii* and artificial diet. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 59(5): 1294-1300.
- Baldissarotto, B. & J. R. Neto. 2005. Jundiá (*Rhamdia* sp.). Pp. 303-325. In: Baldissarotto, B. & L. C. Gomes (Eds.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria, Editora da UFSM, 470p.
- Brannon, E. L., D. F. Amend, M. A. Cronin, J. E. Lannan, S. LaPatra, W. J. McNeil, R. E. Noble, C. E. Smith, A. J. Talbot, G. A. Wedemeyer & H. Wester. 2004. The controversy about salmon hatcheries. Fisheries, 29: 12-31.
- Brasil. 2004. Instrução Normativa MMA nº. 05, de 21 de maio de 2004. Pp. 136-142. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- Campos, J. L. 2005. O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix and Agassiz, 1829). Pp. 327-343. In: Baldissarotto, B. & L. C. Gomes (Eds.). 2005. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria, Editora da UFSM, 470p.

- Caneppele, D., P. Pompeu & J. C. Garavello. 2008. Surubim do Paraíba (*Steindachneridion parahybae*). In: Machado, A. B. M., G. M. Drummond & A. P. Paglia (Eds.). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Belo Horizonte, Biodiversitas.
- CESP (Companhia Energética de São Paulo). 2006. 40 Peixes do Brasil. CESP 40 anos. Rio de Janeiro, Doiis, 208p.
- Garavello, J. C. 2005. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). Neotropical Ichthyology, 3(4): 607-623.
- Harvey, B. & J. Carolsfeld. 1993. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa, International Development Research Center, 144p.
- Hilsdorf, A. W. S. & M. Petreire. 2002. Peixes da bacia do rio Paraíba do Sul: aspecto de sua diversidade e conservação. Ciência Hoje, 30(180): 62-65.
- Honji, R. M., D. Caneppele, A. W. S. Hilsdorf & R. G. Moreira. 2009. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). Environmental Biology of Fishes, 85(3): 207-208.
- von Ihering, R. & P. Azevedo. 1936. A desova e a hipofiseação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. Archivos do Instituto Biológico, 7(9): 107-180.
- von Ihering, R. & P. Azevedo. 1934. A curimatã dos açudes nordestinos (*Prochilodus argenteus*). Archivos do Instituto Biológico, 5: 143-184.
- Kucharczyk, D., R. Kujawa, M. Luczynski, J. Glogowski, I. Babiak & E. Wyszomirska. 1997. Induced spawning in bream, *Abramis brama* (L), using carp and bream pituitary extract and hCG. Aquaculture Research, 28: 139-144.
- Leonardo, A. F. G., E. Romagosa, M. I. Borella & S. R. Batlouni. 2004. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). Aquaculture, 240: 451-461.
- Ludwig, L. A. M., E. Gomes & R. F. Artoni. 2005. Um método de reprodução induzida para o surubim *Steindachneridion melanodermatum* (Siluriformes: Pimelodidae) do Rio Iguaçu. UEPG Ciências Biológicas e da Saúde, Ponta Grossa, 11(3/4): 23-27.
- Luz, R. K., D. A. Reynalte-Tataje, A. A. Ferreira & E. Zaniboni-Filho. 2001. Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. Boletim do Instituto de Pesca, 27(1): 49-55.
- Machado, C. E. & H. C. F. Abreu. 1952. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo. A pesca no Vale do Paraíba. Boletim Industrial Animal, 13: 145-160.
- Miyaki, K., K. Tachihara, R. Ebisu, Y. Tsukashima, Y. Matsumura, S. Fujita, G. Hayashita & O. Tabeta. 1992. Induction of ovarian maturation of the tiger puffer, *Takifugu rubripes* by gonadotropic hormone injections. Fisheries Science, 40: 439-442.
- Oliveira, J. C. & D. F. Moraes Jr. 1997. Dados adicionais à descrição de *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1876) (Teleostei, Siluroidei, Pimelodidae). Boletim do Museu Nacional, 384: 1-11.
- Philippart, J. C. 1995. Is captive breeding an effective solution for the preservation of endemic species? Biological Conservation, 72: 281-295.
- Rosa, R. S. & F. C. T. Lima. 2005. Peixes. In: Machado, A. B., C. S. Martins & G. M. Drummond (Eds.). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Biodiversitas, Belo Horizonte. São Paulo. 2008. Decreto Estadual no. 53494 - 2008 de 02 de outubro de 2008. Diário Oficial do Estado de São Paulo 118(187). Secretaria do Meio Ambiente.
- Schütz, J. H., M. Weingartner; E. Zaniboni-Filho & A. P. O. Nuñez. 2008. Crescimento e sobrevivência de larvas de surubi *Steindachneridion scriptum* nos primeiros dias de vida: influência de diferentes alimentos e fotoperíodos. Boletim do Instituto de Pesca, 34(3): 443-451.
- Thalathiah, S., A. O. Ahmad & M. S. Zaini. 1988. Induced spawning techniques practised at Batu Berendam, Melaka, Malaysia. Aquaculture, 74: 23-33.
- Weingartner, M. & E. Zaniboni-Filho. 2005. Dourado. Pp. 257-281. In: Baldisseroto, B. & L. C. Gomes (Eds.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria, Editora da UFSM, 470p.
- Zaniboni-Filho, E., D. Reynalte-Tataje, A. P. O. Nuñez & S. Meurer. 2008. Photoperiod influence on the cultivation of *Steindachneridion scriptum* (Pisces, Pimelodidae) juvenile. Brazilian Archives of Biology and Technology, 51(3): 555-561.
- Zohar, Y. & C. C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture, 197: 99-136.

Accepted October 11, 2009  
Published December 18, 2009



# 2

## *CAPÍTULO*

---

Desenvolvimento ovariano e perfil de esteróides sexuais plasmáticos em *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae), durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução.

Honji, R. M.; Caneppele, D. & Moreira, R. G.

**Desenvolvimento ovariano e perfil de esteróides sexuais plasmáticos em *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae), durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução.**

Honji, R. M.<sup>1</sup>; Caneppele, D.<sup>2</sup> & Moreira, R. G.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, Trav. 14, 321, 05508-900, São Paulo - SP, Brasil. \*e-mail: [renatagm@ib.usp.br](mailto:renatagm@ib.usp.br)

<sup>2</sup> – Companhia Energética de São Paulo (CESP), Unidade de Hidrobiologia e Aquicultura, Rodovia dos Tamoios, km 38. 12260-000, Brasil.

**Resumo**

*Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) é um bagre de água doce, endêmico da Bacia do Paraíba do Sul, considerado uma importante espécie de teleósteo desta Bacia e está criticamente ameaçada de extinção. Além dessa situação crítica, este teleósteo apresenta sérios problemas relacionados com a reprodução quando em condições de cultivo. No presente estudo, o desenvolvimento oocitário e o perfil plasmático dos esteróides sexuais, estradiol (E<sub>2</sub>), 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17 $\alpha$ -OHP), testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT), foram caracterizados em *S. parahybae* durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução artificial em cativeiro. Quatro estádios de maturação gonadal em *S. parahybae* foram identificados com base nas características morfológicas e histológicas: 1) no crescimento primário ou pré-vitelogênico foi incluído as oogônias, oócitos perinucleolares e alvéolos corticais; 2) no crescimento secundário ou vitelogênico, foi caracterizado pela presença dos oócitos vitelogênicos; 3) após a indução artificial à reprodução, foi considerado o estágio “reprodução”, pois, devido à presença de oócitos com migração nuclear e folículos pós-ovulatórios foram identificados apenas após a indução artificial; e 4) após o período reprodutivo, nos animais que não foram induzidos à reprodução, os oócitos vitelogênicos sofreram atresia, caracterizando o estágio regressão. Em relação ao perfil plasmático dos esteróides sexuais, o perfil de E<sub>2</sub> apresentou um pico no estágio pré-vitelogênico, diminuindo no estágio vitelogênico e permaneceu constante no estágio regressão e no grupo reprodução. Por outro lado, apesar da tendência na diminuição do 17 $\alpha$ -OHP quando o desenvolvimento oocitário progride, provavelmente este esteróide foi convertido no hormônio indutor da maturação final e ovulação (17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one), no entanto, não de forma



suficiente para induzir a maturação final e desova em *S. parahybae* durante o período reprodutivo em cativeiro. Adicionalmente, no grupo reprodução, o  $17\alpha$ -OHP apresentou um drástico aumento, sendo possível observar histologicamente as principais características de um ovário apto à reprodução. Durante o ciclo reprodutivo do surubim do Paraíba, os andrógenos (T e 11-KT) apresentaram maiores valores no estágio vitelogênico, sugerindo um possível papel fisiológico destes esteróides nesta fase de desenvolvimento oocitário. Apesar dos andrógenos serem característicos de machos, em inúmeras fêmeas de peixes foi identificado um perfil plasmático elevado destes esteróides durante a vitelogênese. Entretanto, a função precisa dos andrógenos em fêmeas de peixes permanece pouco investigada. Finalmente, em fêmeas de *S. parahybae* em cativeiro, a disfunção observada foi a falha na maturação final, ovulação e desova, embora estes peixes apresentem uma completa vitelogênese, sugerindo neste caso, uma análise específica no controle do eixo cérebro-hipófise, pois, a conversão de  $17\alpha$ -OHP em  $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (hormônio indutor da maturação final) é controlada endogenamente por este eixo endócrino.

## 1. Introdução

Atualmente, um grande número de espécies de peixes está em condições de domesticação em cativeiro, e cada vez mais, outras espécies são incluídas neste ambiente para o desenvolvimento da aquicultura comercial (Lubzens et al., 2010; Mylonas et al., 2010). No entanto, hoje em dia, importantes espécies para esta atividade comercial, como por exemplo, *Anguilla* spp., *Epinephelus* spp., *Thunnus* spp., *Seriola* spp., entre outras espécies (Ottolenghi et al., 2004), ainda dependem da coleta de reprodutores e juvenis no ambiente natural e, posteriormente, na transferência para o cativeiro (Mylonas et al., 2010). Todavia, esta passagem dos reprodutores do ambiente natural para o cativeiro é acompanhada por disfunções reprodutivas, ou seja, estes animais não apresentam uma reprodução espontânea, sendo necessária uma manipulação ambiental e/ou hormonal para estas espécies se reproduzirem artificialmente em operações de cultivo (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010), e/ou ainda apresentam, uma baixa qualidade dos gametas (oócitos e espermatozoides) (Brooks et al., 1997; Bobe & Labbé, 2010; Schulz et al., 2010).

Do mesmo modo, em peixes neotropicais conhecidos como peixes de piracema, ou seja, peixes que realizam uma migração reprodutiva durante o período reprodutivo, quando esta migração não é possível de ser realizada (condições de cultivo), estas espécies reofílicas não se reproduzem naturalmente. De acordo com Zohar & Mylonas (2001), a disfunção mais comum em peixes teleósteos nestas condições, é a falha na maturação final, ovulação e

desova, embora estes peixes apresentem uma completa vitelogênese. Além disso, mudanças no ambiente natural causados por ações antrópicas (*i.e.*, construções de barragens nos rios, poluição industrial e/ou doméstica), podem agir como uma barreira para a dispersão das espécies e/ou prevenir a passagem a jusante ou a montante neste ecossistema (no caso de reservatórios), resultando assim, em sérios impactos para a ictiofauna nativa (Wilson, 1988; Agostinho et al., 1999, 2007; Godinho et al., 2007).

Durante o ciclo reprodutivo de fêmeas de peixes teleósteos sexualmente maduras no ambiente natural, em geral, quatro principais estádios reprodutivos podem ser distinguidos: 1) crescimento primário ou pré-vitelogênico; 2) crescimento secundário ou vitelogênico; 3) maturação final; e 4) regredido (Grier, 2000; Coward et al., 2002; Patiño & Sullivan, 2002; Grier et al., 2007; França et al., 2010; Lubzens et al., 2010). No entanto, várias espécies de peixes teleósteos neotropicais, quando transferidas para um ambiente confinado (cativeiro/piscicultura), apresentam basicamente três principais estádios reprodutivos, a saber: 1) crescimento primário; 2) crescimento secundário; e 3) regressão (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010).

Estes estádios reprodutivos levam em considerações as descrições das diferentes fases do desenvolvimento oocitário, baseados principalmente pela distinta morfologia, histologia e características fisiológicas e/ou bioquímicas celulares (Wallace & Selman, 1981; Tyler & Sumpter, 1996; Grier, 2000; Coward et al., 2002; Patiño & Sullivan, 2002; Strüssmann & Nakamura, 2002; Grier et al., 2007, 2009; Lubzens et al., 2010). Desta forma, as descrições das diferentes fases do desenvolvimento oocitário são ferramentas úteis para a compreensão dos eventos celulares ocorridos durante a oogênese e, portanto, levam a aquisição de conhecimento básico da biologia reprodutiva de uma espécie, e também possuem aplicações práticas para o gerenciamento do ciclo reprodutivo em cativeiro. Ainda assim, fornecem bases biológicas para pesquisas experimentais específicas, e futuras comparações entre as espécies.

Além da importância na produção de gametas, os ovários são importantes na produção de vários esteróides sexuais, que apresentam diferentes papéis fisiológicos fundamentais no desenvolvimento oocitário. Adicionalmente, alguns estudos apontam que estas substâncias são responsáveis pela qualidade dos gametas (Brooks et al., 1997; Bobe & Labbé, 2010), além de ser considerado um dos indicadores na falha da reprodução em cativeiro (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010). O esteróide gonadal com a função melhor conhecida é o estradiol ( $E_2$ ), que é o principal responsável pela indução na síntese e secreção hepática de vitelogenina (Grier et al., 2009; Lubzens et al., 2010). O progestágeno,  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona ( $17\alpha$ -OHP) é o precursor do  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one,

considerado como o esteróide responsável pela indução da maturação final e ovulação em peixes teleósteos (Nagahama, 1997). No entanto, devido a falta de imunoenaios específicos para *17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one*, o perfil plasmático do precursor, *17 $\alpha$ -OHP* em algumas espécies neotropicais apresentaram interessantes interpretações fisiológicas (Amaral et al., 2007; Correia et al., 2010). Em relação aos andrógenos, testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT), apesar de ter sido relatado no plasma de inúmeras fêmeas de teleósteos, a verdadeira função dos andrógenos em fêmeas ainda permanece sendo investigada (Borg, 1994; Slater et al., 1994; Lokman et al., 2002; Desjardins et al., 2005; Matsubara et al., 2005; Amaral, 2009; Tosaka et al., 2010).

Levando em consideração a (s) influência (s) do cativeiro na fisiologia de peixes teleósteos e os impactos ambientais descritos acima, somado ao declínio das fontes naturais devido à pesca predatória mundial (FAO, 2010) e a presença de várias espécies de peixes teleósteos na lista de espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2011), a piscicultura passou a desempenhar um papel fundamental na conservação das espécies ameaçadas de extinção, sendo conhecida ultimamente como piscicultura de conservação. No Brasil, várias espécies de peixes teleósteos também estão inclusas na lista de espécies ameaçadas de extinção (Brasil, 2004; Rosa & Lima, 2008), no entanto, são poucas as espécies que possuem um programa de conservação (Hostim-Silva et al., 2005; ANEEL, 2006; Rosa & Lima, 2008).

Dentro deste contexto, um importante peixe migrador de água doce da ictiofauna brasileira é o bagre (*catfish*) *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae), comumente conhecido como surubim do Paraíba. É um peixe potamódromo (reofílico), ictiófago, endêmico da bacia do Paraíba do Sul (Garavello, 2005), seriamente ameaçada de extinção (Honji et al., 2009a), e a sua biologia reprodutiva é pouco compreendida. No ano de 2003 esta espécie foi incluída no programa de conservação realizada pela Companhia Energética de São Paulo (CESP) e um dos principais objetivos deste programa é obter alevinos em cativeiro. No entanto, em cativeiro, *S. parahybae* apresenta disfunções reprodutivas, principalmente as fêmeas quando são submetidas ao sistema de cultivo, pois não desovam espontaneamente durante o período reprodutivo (CESP, 2006). Adicionalmente, Caneppele et al. (2009) reportam pela primeira vez a reprodução de *S. parahybae* de origem selvagem em cativeiro, e estes autores comentam que as fêmeas de surubim do Paraíba liberam uma quantidade inferior de oócitos se comparados a outras espécies de Siluriformes. Estes fatos ressaltam a importância de aumentar o conhecimento sobre a biologia reprodutiva desta espécie.

O conhecimento da dinâmica do desenvolvimento oocitário e os eventos fisiológicos associados ao processo reprodutivo (*i.e.*, perfil plasmático dos esteróides sexuais), em animais em cultivo são importantes para o conhecimento da biologia reprodutiva das espécies reofílicas que apresentam disfunções reprodutivas neste ambiente, além de acrescentar conhecimentos sobre os efeitos do cativeiro nos processos reprodutivos. Tendo em vista todos estes pontos abordados, os principais objetivos deste estudo foram: 1) descrever as mudanças das células germinativas ovarianas de fêmeas adultas de *S. parahybae*, durante os diferentes estádios do ciclo reprodutivo, e após a indução à reprodução artificial em cativeiro; e concomitantemente, 2) caracterizar o perfil plasmático dos principais esteróides sexuais ( $E_2$ ,  $17\alpha$ -OHP, T e 11-KT), nestes mesmos animais.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Desenho experimental e coleta dos animais

O experimento foi conduzido na Piscicultura da CESP (23° 24' 53,71'' S e 45° 35' 59,82'' W), localizada no município de Paraibuna (São Paulo, Brasil). Em dezembro de 2007, cem fêmeas adultas de *S. parahybae*, nascidas e criadas na CESP (primeira geração, F1; Caneppele et al., 2009), foram aleatoriamente distribuídas em dois viveiros (200m<sup>2</sup>) nesta piscicultura (50 fêmeas/viveiro). Durante o período experimental, os animais foram alimentados diariamente “*ad libitum*” com ração comercial extrusada para carnívoros, com teor de proteína bruta de 40% e granulometria de 6 mm de diâmetro (Purina TC 40). A concentração de oxigênio dissolvido na água foi monitorada diariamente com um oxímetro (Horiba – ModU10) que registrou também a temperatura da água.

As fêmeas de *S. parahybae* foram coletadas ao longo do ano, mensalmente (exceto durante a estação de inverno), com o intuito de obter amostras nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo. No momento de cada coleta, quatro animais foram amostrados aleatoriamente em cada viveiro, e transportados para o laboratório da CESP. Os peixes no laboratório foram anestesiados por imersão em água contendo benzocaína anestésica (*ethyl-p-aminobenzoate*) previamente solubilizada em etanol, na proporção de 1g/20L de água, e os dados morfológicos e ponderais foram mensurados. Em seguida, uma amostra de sangue foi coletada por punção da vasculatura caudal, com o uso de seringas de 5 ml e agulhas descartáveis previamente heparinizadas (*Liquemine – Roche*<sup>®</sup>). O sangue coletado foi transferido para tubos “falcon” também previamente heparinizados e centrifugados por 10 min a 655,2 g. Logo em seguida, o plasma foi separado em alíquotas e acondicionado em

criotubos, congelado imediatamente em gelo seco e posteriormente armazenado em freezer à -80°C até o processamento.

Posteriormente a este procedimento, os animais foram sacrificados por decapitação, e seus ovários rapidamente removidos e pesados, para posteriormente ser calculado o índice gonadossomático (IGS) [IGS = (massa total dos ovários / massa corpórea total) X 100] (Vazzoler, 1996), e logo em seguida, imersas em solução fixadora, de acordo com cada técnica histológica (descritas abaixo). Os procedimentos adotados para sacrificar os animais neste estudo estão de acordo com o Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolo: 072/2008).

Adicionalmente, para analisar os ovários após a indução à reprodução artificial em cativeiro de *S. parahybae*, fêmeas sexualmente maduras foram selecionadas de acordo com a metodologia descrita por Caneppele et al. (2009) e induzidas artificialmente pela técnica de hipofiseção, metodologia que foi modificada dos protocolos descritos por von Ihering & Azevedo, (1934, 1936) e Harvey & Carolsfeld, (1993). Neste caso um grupo adicional denominado “reprodução” foi considerado.

Neste grupo, 30 fêmeas (no total) foram utilizadas na indução artificial à reprodução, sendo que, 15 fêmeas foram utilizadas na primeira indução hormonal, e 15 fêmeas na segunda indução hormonal (1 semana de diferença entre cada reprodução). Os animais que responderam positivamente à reprodução artificial foram sacrificados nos seguintes tempos: 0, 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a extrusão a seco dos gametas (ESG). Dois animais eram anestesiados, coletada uma amostra de sangue e sacrificados nestes diferentes intervalos de tempo. Posteriormente os ovários foram rapidamente retirados, coletados, pesados e logo em seguida imersos em solução fixadora, de acordo com cada técnica histológica (descritas abaixo). O protocolo de indução à reprodução artificial em cativeiro de *S. parahybae* e os resultados dos dados reprodutivos (fêmeas que responderam positivamente à reprodução, quantidade de ovos liberados, entre outros dados), estão descritos em detalhe no Capítulo 5.

## 2.2. Análise histológica dos ovários

Para esta análise, as gônadas em cada estágio de maturação gonadal foram removidas e fragmentos foram fixados por 20-24 horas em solução de Bouin acético e desidratadas com uma série crescente de diluições de etanol. Em seguida, o material foi diafanizado em solução de xilol (*dimethylbenzene*), e infiltrado em Paraplast<sup>®</sup> (Erv-Plast, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda) de acordo com os procedimentos histológicos rotineiros (Behmer et al., 1976). Cortes seriados com 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina. Os cortes

preparados foram analisados e documentados, utilizando-se um sistema computadorizado de captura de imagens (microscópio de luz transmitida – *Leica DM 1000*; câmera fotográfica – *Leica DFC 295*; e programa de captura de imagem – *Leica Application Suíte Professional, LAS V3.6*).

Adicionalmente, para melhor visualização e registro do desenvolvimento oocitário, alguns ovários fixados em solução de Bouin acético (20-24 horas), foram transferidos e desidratados com uma série crescente de etanol (70% por 24 horas; 95% por 4 horas), transferidos novamente para uma solução de resina metacrilato e etanol absoluto (proporção de 1:1) por 10 horas, infiltrado em solução de resina pura por mais 10 horas e embebidos em resina. Cortes com 3  $\mu\text{m}$  foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina, e ácido periódico de Schiff (PAS) + hematoxilina + *Metanil Yellow* (Quintero-Hunter et al., 1991). Os cortes preparados também foram analisados e documentados com o mesmo sistema computadorizado de captura de imagem descrito acima.

### 2.3. Caracterização dos estádios reprodutivos

Em relação ao desenvolvimento ovariano foram identificados e descritos os tipos celulares germinativos e suas respectivas características, considerando-se as afinidades tintoriais e os diferentes estádios de desenvolvimento gonadal durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae*. A caracterização dos estádios reprodutivos dos oócitos de *S. parahybae* foi baseado nas classificações de Rocha & Rocha (2006), Grier et al. (2009) e Brown-Peterson et al. (2009) (para teleósteos em geral); Grier (2000) (para *Centropomus undecimalis*, Centropomidae); Grier et al. (2007) (para *Oncorhynchus mykiss*, Salmoniformes); França et al. (2010) (para *Gymnotus sylvius*, Gymnotiformes); Kunkel & Flores (1996), Romagosa et al. (2003, 2005), Leonardo et al. (2006) e Ghiraldelli et al. (2007) (para Siluriformes).

### 2.4. Análises dos esteróides sexuais

O perfil plasmático de  $E_2$ ,  $17\alpha\text{-OHP}$ , T e 11-KT foram quantificados por elisaimunoensaio (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - ELISA*). Para  $E_2$ ,  $17\alpha\text{-OHP}$  e T, as análises foram realizadas em duplicada com “kits” comerciais de humanos (*Interkit*), e para 11-KT (Cayman), também foram realizadas análises em duplicata, no entanto, com “kit” específico para teleósteos. Todos estes ensaios estão de acordo com as especificações o fabricante, e a leitura das placas foi realizada em leitora de microplaca (Molecular Devices, SpectraMax 250) com comprimento de onda de 450 nanômetros para  $E_2$ ,  $17\alpha\text{-OHP}$  e T e 405 nanômetros para 11-KT.

Adicionalmente, o paralelismo de diluições com algumas amostras com a curva padrão foram realizadas para todos os “kits”. Além disso, testes de inter- e intra-ensaios com as amostras, e teste de inter-placa (curva padrão) foram realizadas para todos os “kits”.

### 2.5. 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 o estágio de maturação gonadal e após a indução à reprodução (grupo reprodução). As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando-se a análise de variância (one-way ANOVA), seguida pelo teste *Student-Newman-Keuls* (SNK) para análises paramétricas ou o teste *Dunn's* ou *Tukey* para as análises não-paramétricas. Em todas as análises, diferenças significativas foram consideradas quando  $P < 0,05$  (Zar, 2010). Estas análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico *SigmaStat* para *Windows* (versão, 3.10, *Copyright*).

## 3. Resultados

### 3.1. Análise histológica dos ovários

Nestas análises, a primeira fase das células germinativas, as oogônias (Figs. 1a, b) foram identificadas em todos os animais. Uma das características principais destas células é o pequeno tamanho (Fig. 1a) e a distribuição em ninhos (Fig. 1b), que possuem em sua periferia células pré-foliculares (Fig. 1a, b). As oogônias entram em meiose, originando posteriormente os oócitos e estes últimos, deixam os ninhos de oogônias (Fig. 1c, d), que também são recobertos pelas células foliculares.

Seguindo o desenvolvimento ovariano, os primeiros oócitos caracterizados são os chamados, oócitos perinucleolares (Figs. 1e, f). Estes oócitos possuem um núcleo esférico, um citoplasma basófilo e vários nucléolos periféricos (Fig. 1f). A fina camada celular envolvendo o oócito também foi possível de se observar (Fig. 1f). Neste momento inicia-se o crescimento primário. Durante o crescimento primário (por volta de maio a outubro), ocorre um aumento significativo do volume do oócito (diferentes tamanhos de oócitos perinucleolares são identificados na figura 1e). Esta fase de desenvolvimento oocitário foi identificada em todos os animais.

No decorrer do crescimento primário, os alvéolos corticais iniciam a sua formação. Estes oócitos apresentam uma típica vacuolização na periferia do citoplasma próximo a membrana celular (Figs. 2a, b), com o número e tamanho destas vesículas aumentando

progressivamente com o desenvolvimento do oócito. Estas vesículas aparentemente surgem no citoplasma dos oócitos como esferas vazias devido à falta de coloração (pelo método hematoxilina-eosina). Adicionalmente, nestes oócitos as células foliculares e a zona pelúcida foram mais facilmente identificadas (Fig. 2c), e conforme avançam no desenvolvimento as células foliculares sofrem também uma hipertrofia (Fig. 2d).

No crescimento secundário (por volta de novembro a fevereiro), os oócitos sofrem outro aumento acentuado em seu tamanho, devido à vitelogênese exógena e os oócitos são denominados de oócito vitelogênico (Figs. 2e, f). Com a crescente deposição dos glóbulos de vitelo por todo o citoplasma do oócito, os alvéolos corticais são deslocados para a periferia do citoplasma (Fig. 3a). Adicionalmente, nestes oócitos, a zona pelúcida e as células foliculares hipertrofiadas são facilmente identificadas (Fig. 3a), e também foi observada a micrópila (Fig. 3b), uma estrutura especial situada no pólo animal do oócito, que permite a entrada do espermatozóide no oócito.

Ainda em relação ao desenvolvimento ovariano, os oócitos atresícos (Figs. 3c-e) foram identificados em todo o ciclo reprodutivo de *S. parahybae*, sendo mais frequentes no final do período reprodutivo (por volta de março a abril). Os oócitos atresícos consistem de oócitos em processo de reabsorção e são caracterizados por uma desorganização estrutural e degeneração celular. Todas as estruturas do folículo ovariano (oócito e células foliculares e tecais) serão reabsorvidas. O oócito atresíco não apresenta uma forma definida e apresentam vários vacúolos dependendo da fase de degeneração (Fig. 3c), sendo observado um floculado amarelado e sem forma (Fig. 3d), e as células foliculares também perdem o seu formato (Fig. 3e).

Todos estes processos acima descritos foram observados em fêmeas de *S. parahybae* durante o ciclo reprodutivo em cativeiro. No entanto, a fase final de maturação dos oócitos só foi possível de se observar, quando estas fêmeas foram induzidas artificialmente à reprodução. A principal característica destes oócitos é a migração do núcleo de contorno irregular para a periferia do citoplasma (Fig. 3f) em direção à micrópila (Fig. 3b). A presença de folículos pós-ovulatórios (POFs) (Figs. 4a-f), originados da liberação do oócito (ovulação) e a permanência das células foliculares e tecais no interior dos ovários, também foi identificada durante este período. Estas células tendem a colapsar devido a processos mecânicos e inicialmente não apresentam células em seu lúmen.

Apesar dos POFs serem observados do momento zero até as 48 horas ESG de *S. parahybae*, algumas diferenças qualitativas dos POFs foram observadas entre os diferentes intervalos de tempo. Inicialmente (0 e 6 horas após ESG), os lúmens dos POFs foram



facilmente identificados nas análises histológicas (respectivamente: Figs. 4a, b). Com o passar do tempo (12, 24 e 36 horas após ESG), as células foliculares e tecaís apresentam-se mais entremeadas e penetram cada vez mais no interior do lúmen (respectivamente: Figs. 4c, d, e), até o momento em que foi difícil de identificar o lúmen (48 horas após ESG) (Fig. 4f).

### 3.2. Caracterização dos estádios reprodutivos

Apesar de se identificar vários oócitos em diferentes fases de desenvolvimento, no presente estudo foram considerados apenas 3 estádios de desenvolvimento ovariano de *S. parahybae* em cativeiro, além do grupo denominado “reprodução”, e que será posteriormente discutido.

As fêmeas no estágio pré-vitelogênico ou crescimento primário (maio-outubro), apresentavam ninhos de oogônias, muitos oócitos perinucleolares e alguns oócitos alvéolos corticais (Figs. 5a, b). Neste estágio de maturação gonadal 28 fêmeas foram amostradas, sendo que, o comprimento padrão variou de 29,00 – 40,50 cm (média  $35,93 \pm 0,64$ ) e massa corpórea total de  $698,52 \pm 29,50$  g (Tabela 1).

No crescimento secundário ou estágio vitelogênico (novembro-fevereiro), os oócitos vitelogênicos foram os oócitos predominantes nesta fase (Figs. 5c, d), mas poucos oócitos alvéolos corticais, perinucleolares e oogônias também foram observados. Neste estágio, foram amostradas 22 fêmeas, com o comprimento padrão variando de 29,50 – 40,50 cm (média  $34,50 \pm 0,55$ ) e massa corpórea total de  $596,66 \pm 25,35$  g (Tabela 1).

O último estágio de desenvolvimento ovariano caracterizado durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae*, foi o estágio regressão (março-abril). Neste estágio a presença de vários oócitos em diferentes estágios de atresia foi observada nos ovários (Figs. 5e, f). Neste estágio de maturação gonadal 18 fêmeas foram amostradas, sendo que, o comprimento padrão variou de 30,00 – 38,50 cm (média  $33,61 \pm 0,46$ ) e massa corpórea total de  $603,85 \pm 29,97$  g (Tabela 1).

No grupo reprodução (Figs. 6a-d), os animais apresentaram diversos POFs, no entanto, vários oócitos vitelogênicos, alguns oócitos com alvéolos corticais também foram observados nos animais induzidos artificialmente à reprodução. Nas 24 fêmeas induzidas à reprodução, o comprimento padrão variou de 31,50 – 37,00 cm (média  $33,40 \pm 0,24$ ) e massa corpórea total de  $555,70 \pm 13,14$  g (Tabela 1).

### 3.3. Índice gonadossomático (IGS)

Os valores de IGS se alteraram significativamente em *S. parahybae* durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução artificial, ou seja, à medida que a maturação

avançou, os valores de IGS aumentaram significativamente do estágio pré-vitelogênico ( $0,40 \pm 0,14$ ) para o estágio vitelogênico ( $1,59 \pm 0,24$ ) e aptas para a reprodução ( $1,54 \pm 0,15$ ), e posteriormente, diminuiu no estágio regressão ( $0,57 \pm 0,09$ ) ( $P < 0,01$ ) (Tabela 1).

### 3.4. Análises dos esteróides sexuais

O perfil plasmático de  $E_2$  variou durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae*, com maior valor no estágio pré-vitelogênico ( $1,21 \pm 0,08$  ng/ml) se comparado ao estágio vitelogênico ( $0,86 \pm 0,05$  ng/ml) ( $P < 0,05$ ) e permaneceu constante no estágio regressão ( $0,88 \pm 0,14$  ng/ml) (Fig. 7a). Após a indução à reprodução (Fig. 7b), os valores de  $E_2$  não apresentaram diferenças significativas do momento zero até 48 horas após ESG ( $1,10 \pm 0,13$  ng/ml, momento zero;  $0,94 \pm 0,23$  ng/ml, 6 horas após ESG;  $1,23 \pm 0,33$  ng/ml, 12 horas após ESG;  $1,00 \pm 0,31$  ng/ml, 24 horas após ESG;  $0,74 \pm 0,13$  ng/ml, 36 horas após ESG e  $0,81 \pm 0,12$  ng/ml, 48 horas após ESG).

Em relação ao  $17\alpha$ -OHP, apesar da tendência na diminuição do estágio pré-vitelogênico ( $0,99 \pm 0,14$  ng/ml) para o estágio vitelogênico ( $0,68 \pm 0,06$ ), não foi identificada diferença significativa (Fig. 7c) nesta transição. No entanto, do estágio vitelogênico para o estágio regressão ( $1,12 \pm 0,12$  ng/ml), ocorreu um aumento significativo ( $P < 0,01$ ) (Fig. 7c). Após a indução à reprodução (Fig. 7d), no momento zero, os valores de  $17\alpha$ -OHP aumentaram abruptamente se comparados aos outros estádios de maturação, diminuindo progressivamente com o passar do tempo, ou seja, logo em seguida da ESG, os valores de  $17\alpha$ -OHP eram de  $11,47 \pm 3,36$  ng/ml (momento zero), diminuindo para  $5,30 \pm 1,13$  ng/ml (6 horas após ESG),  $4,05 \pm 0,79$  ng/ml (12 horas após ESG),  $1,92 \pm 0,26$  ng/ml (24 horas após ESG),  $1,02 \pm 0,23$  ng/ml (36 horas após ESG) e  $0,81 \pm 0,13$  ng/ml (48 horas após ESG) ( $P < 0,01$ ).

No que tange o perfil plasmático dos andrógenos em fêmeas de *S. parahybae* durante o ciclo reprodutivo, os valores de T e 11-KT (respectivamente: Figs. 8a, c) aumentaram do estágio pré-vitelogênico (respectivamente:  $1,06 \pm 0,15$  ng/ml e  $0,04 \pm 0,01$  ng/ml) para o estágio vitelogênico (respectivamente:  $4,21 \pm 0,31$  ng/ml e  $0,07 \pm 0,01$  ng/ml) ( $P < 0,01$ ) e diminuíram no estágio regressão (respectivamente:  $0,75 \pm 0,07$  ng/ml e  $0,03 \pm 0,01$  ng/ml) ( $P < 0,01$ ). Após a indução à reprodução, não foi identificada nenhuma variação significativa no perfil plasmático de T (Fig. 8b), momento zero ( $1,34 \pm 0,33$  ng/ml), 6 horas após ESG ( $0,59 \pm 0,15$  ng/ml), 12 horas após ESG ( $0,60 \pm 0,15$  ng/ml), 24 horas após ESG ( $0,54 \pm 0,86$  ng/ml), 36 horas após ESG ( $0,70 \pm 0,23$  ng/ml) e 48 horas após ESG ( $0,95 \pm 0,18$  ng/ml). Entretanto, os valores de 11-KT no momento zero ( $0,05 \pm 0,01$  ng/ml) após ESG, foram

significativamente diferentes dos demais valores de 11 KT ( $P < 0,01$ ), *i.e.*, 6 horas após ESG ( $0,03 \pm 0,006$  ng/ml), 12 horas após ESG ( $0,02 \pm 0,007$  ng/ml), 24 horas após ESG ( $0,01 \pm 0,002$  ng/ml), 36 horas após ESG ( $0,01 \pm 0,001$  ng/ml) e 48 horas após ESG ( $0,01 \pm 0,002$  ng/ml) (Fig. 8d).

Para a validação dos kits de esteróides sexuais, os testes inter- e intra-ensaios com as amostras, variaram respectivamente: 1,17 a 2,79% e 0,31 a 25,50% ( $E_2$ ), 0,51 a 1,12% e 0,47 a 20,44% ( $17\alpha$ -OHP), 0,21 a 2,48% e 0,87 a 22,48% (T), e 0,75 a 1,21% e 0,15 a 15,49% (11-KT). Para o teste de inter-placa, a curva padrão de  $E_2$  (6 calibradores) variou de 2,90 a 9,38%, para  $17\alpha$ -OHP (7 calibradores) variou de 2,19 a 16,71%, para T (6 calibradores) variou de 2,07 a 5,82% e para 11-KT (8 calibradores) variou de 3,30 a 10,91%.

#### 4. Discussão

Macroscopicamente, os ovários de *S. parahybae* localizam-se na cavidade abdominal, ventralmente aos rins e à vesícula gasosa, dorsalmente ao tubo digestivo e são ligadas à parede dorsal do celoma pelo mesentério, e nossas observações macroscópicas estão de acordo com o padrão anatômico básico da maioria dos teleósteos (Wootton, 1990; Moyle & Cech, 2003; Zavala-Camin, 2004; Parenti & Grier, 2004). Além do mais, estas características anatômicas estudadas em *S. parahybae*, correspondem à maioria das características relatadas para outras espécies de Siluriformes (Romagosa et al., 2003; Leonardo et al., 2004). Microscopicamente, em geral, o processo de desenvolvimento em estrutura sacular observado nos ovários de *S. parahybae*, indica uma condição cisto-ovariano (Grier et al., 2009).

De uma forma em geral, devido à íntima relação entre os processos de maturação gonadal e o ganho de massa corpórea total, principalmente devido às alterações observadas nos ovários, a análise do IGS adicionada aos estádios de maturação gonadal são parâmetros considerados muito importantes para definir o período reprodutivo de uma espécie (Vazzoler, 1996). Como esperado para *S. parahybae*, os valores de IGS aumentam quando o desenvolvimento gonadal progride mesmo em cativeiro, ou seja, do estágio pré-vitelogênico para o estágio vitelogênico os valores de IGS aumentam, devido principalmente, ao aumento da incorporação de vitelogenina nos oócitos (oócito perinucleolar para o oócito vitelogênico). Os dados de IGS obtidos no nosso estudo sugerem que o período reprodutivo de *S. parahybae* em cativeiro na CESP (Paraibuna) ocorra de novembro a fevereiro, durante o final da primavera e metade do verão, e quando aumenta a pluviosidade nesta região. Para *S. melanodermatum* (Siluriformes: Pimelodidae) o período de reprodução é de outubro a

dezembro (Ludwig et al., 2005). No entanto, acredita-se que o período reprodutivo de *S. melanodermatum* seja mais longo (provavelmente durante a época de verão).

As alterações macroscópicas observadas nos ovários durante o ciclo reprodutivo de qualquer espécie (principalmente no aumento de tamanho) refletem a dinâmica do desenvolvimento oocitário, que nem sempre é possível de se analisar macroscopicamente. Vários autores (West et al., 1990; Dias et al., 1998; Honji et al., 2006), constataram alguns problemas relacionados com uma análise apenas levando em consideração o aspecto macroscópico dos ovários, que em geral, pode levar a uma classificação errônea, e se esta classificação for utilizada para um gerenciamento pesqueiro, pode ocasionar a depleção de um estoque pesqueiro (Dias et al., 1998; Honji et al., 2006). Além do mais, uma classificação equivocada do desenvolvimento ovariano pode ocasionar problemas em outras atividades, como por exemplo, a proposta do presente estudo, ou seja, na piscicultura de conservação do surubim do Paraíba.

Neste contexto, as análises microscópicas do desenvolvimento oocitário aqui apresentadas, são necessárias e os resultados obtidos permitiram uma avaliação precisa deste desenvolvimento em *S. parahybae*. As análises microscópicas indicaram que a produção de oócitos do surubim do Paraíba é de forma ilimitada como na maioria das fêmeas de teleósteos (Grier, 2000; Grier et al., 2007; França et al., 2010; Quagio-Grassiotto et al., 2011). Esta forma ilimitada de produção de oócitos durante o ciclo de vida do surubim do Paraíba deve-se principalmente pela constante proliferação das oogônias (oogônias foram identificadas durante todo o ciclo reprodutivo). Os ninhos de oogônias descritos em várias espécies de teleósteos são os primeiros tipos celulares identificados nas análises rotineiras de histologia (inclusão com parafina e/ou *paraplast*). No entanto, em *G. sylvius* (França et al., 2010), em *C. undecimalis* (Grier, 2000) e em *O. mykiss* (Grier et al., 2007), utilizando-se preparações especiais (com historesina) os autores identificaram uma simples oogônia e segundo estes autores, as oogônias podem individualmente (ou em grupos) entrar em meiose formando estes ninhos de oogônias. Em *S. parahybae*, uma simples oogônia também foi identificado, no entanto, a localização desta célula (posição mais central na lamela ovariana) e a morfologia (mais arredondada), indicam que esta oogônia está em uma fase mais desenvolvida à encontrada pelos autores supracitados.

As oogônias entram em meiose originando os oócitos, e antes do final da formação do folículo, inicia-se o crescimento primário (Grier, 2000; França et al., 2010; Mazzoni et al., 2010; Quagio-Grassiotto et al., 2011). Durante o crescimento primário ou estágio pré-vitelogênico em *S. parahybae*, caracterizado pela presença de múltiplos oócitos

perinucleolares e alguns alvéolos corticais, um aumento significativo do volume do oócito foi observado (se comparado aos ninhos de oogônias), devido principalmente a síntese de vários componentes citoplasmático. Os oócitos perinucleolares em *S. parahybae* são facilmente identificados nas análises histológicas, como descritas nos resultados. Segundo Wallace & Selman (1981) e Sarasquete et al. (2002), a quantidade de nucléolos na periferia dos oócitos perinucleolares e o diâmetro destes oócitos variam entre as espécies. Em *S. parahybae* variações de quantidade de nucléolos e diâmetro destes oócitos foram observadas durante o crescimento primário.

Ainda no crescimento primário, no início da deposição dos alvéolos corticais, estes se encontram dispersos em todo o citoplasma dos oócitos em *S. parahybae*, e com o avanço da maturação, tornam-se progressivamente maiores (em diâmetro). Sugerem-se as seguintes funções para o conteúdo dos alvéolos corticais: após a ovulação, este conteúdo previne a poliespermia (Nagahama, 1983); e/ou o conteúdo do alvéolo cortical é liberado no interior do espaço perivitelínico, enrijecendo a zona pelúcida e provavelmente atuam na proteção do embrião contra injúrias mecânicas (Shibata et al., 2000; Grier et al., 2009). Além disso, em Perciformes marinhos, o conteúdo dos alvéolos corticais, provavelmente de origem lipídica, apresenta um papel importante na flutuabilidade dos ovos na coluna de água (Grier et al., 2009).

Adicionalmente, a zona radiata ou pelúcida (camada acelular) aparece mais espessa e as estrias radiais são mais nítidas nos oócitos alvéolos corticais. Foi possível observar que as células foliculares, sofrem uma hipertrofia neste momento, o que parece ser uma característica comum em Siluriformes, pois, esta hipertrofia das células foliculares também foi observada em outras espécies, como por exemplo, em *Rhamdia quelen* e *Pseudoplatystoma corruscans* (respectivamente, Ghiraldelli et al., 2007; Leonardo et al., 2006). Maiores investigações sobre esta hiperplasia nas células foliculares devem ser realizadas, no entanto, Leonardo et al., (2006) sugerem que esta hiperplasia das células foliculares em *P. corruscans* está relacionada ao início da atresia folicular, o que no presente estudo, não é sugerido para *S. parahybae*, pois, esta hiperplasia foi observada nos oócitos alvéolos corticais, nos oócitos vitelogênicos e também nos oócitos com migração nuclear.

No crescimento secundário ou estágio vitelogênico em *S. parahybae*, um novo aumento (agora acentuado) ocorre nos oócitos em desenvolvimento. Este aumento dos oócitos ocorreu principalmente, devido à incorporação de vitelogenina, uma glicolipofosfoproteína sintetizada pelo fígado, transportada pela corrente sanguínea e incorporada pelo oócito (Patiño & Sullivan, 2002; Grier et al., 2007, 2009; Lubzens et al., 2010). Este processo descrito acima

é conhecido como vitelogênese, ou seja, refere-se ao processo de “tomada” de vitelogenina e transformação da mesma em lipoproteína e proteína de vitelo no oócito, onde é estocada nos glóbulos de vitelo (Grier et al., 2009; Lubzens et al., 2010). Adicionalmente, a incorporação de outras moléculas (*i.e.*, vitaminas e lipídios), auxilia neste aumento do diâmetro dos oócitos (Lubzens et al., 2010).

Durante o estágio vitelogênico em *S. parahybae*, a zona pelúcida continua se desenvolvendo nos oócitos, e no pólo animal do oócito vitelogênico, uma estrutura especial e única pode ser identificada, a micrópila. Esta estrutura forma-se nos oócitos vitelogênicos quando a zona pelúcida sofre uma invaginação e as células foliculares desenvolvem-se como se fossem um canal em forma de cone, terminando no citoplasma do oócito. Uma determinada célula folicular modificada (célula micropilar) localizada ao redor da abertura da micrópila, com tamanho e forma variados dependendo da espécie a ser considerada, permite a passagem do espermatozóide durante a fertilização, uma vez que, a ausência de acrossoma na cabeça do espermatozóide em teleósteos, justifica a presença desta estrutura única nos oócitos de peixes (Ravaglia & Maggese, 2002; Kunz, 2004; Grier et al., 2009). Ainda em relação à micrópila, em *Salminus hilarii* (Honji et al., 2009b) esta estrutura foi identificada em oócitos vitelogênicos e/ou em oócitos aptos à reprodução, assim como, em *P. coruscans* (Rizzo et al., 1998; Marques et al., 2008), em *Prochilodus marggravii* (Rizzo et al., 1998, 2003), em *P. affinis* (Rizzo et al., 1998) em *S. brasiliensis* (Rizzo et al., 1998), e em outras espécies de teleósteos neotropicais (Ricardo et al., 1996). Entretanto, segundo França et al. (2010), no teleósteo neotropical *G. sylvius*, a micrópila surge durante o crescimento primário nesta espécie (no oócito alvéolo cortical). Adicionalmente, descrição morfológica da micrópila tem sido alvo de estudo em diferentes espécies de teleósteos, além dessas espécies neotropicais descritas acima, outras espécies de peixes, como por exemplo, espécies das famílias: Salmonidae, Esocidae e Gasterosteidae também são estudadas (Kunz, 2004).

Nas fêmeas de *S. parahybae* foi observado que estes reprodutores conseguem desenvolver os ovários até o crescimento secundário (oócitos vitelogênicos) e não atingem a maturação final (migração nuclear ou quebra da vesícula germinativa em direção à micrópila), e conseqüentemente, não ovulam e não desovam espontaneamente em cativeiro. Além de *S. parahybae*, várias espécies de peixes teleósteos quando transferidos para o cativeiro apresentam um bloqueio no processo reprodutivo (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010), sendo que, o (s) mecanismo (s) que levam ao bloqueio da reprodução em cativeiro ainda permanece desconhecido. Adicionalmente, em algumas espécies de peixes, a reprodução em cativeiro pode ser obtida através da manipulação ambiental, como por

exemplo, alterando o fotoperíodo, a temperatura da água, o substrato para a desova, entre outros (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010). Entretanto, para a maioria das espécies de peixes neotropicais (incluindo *S. parahybae*) quando transferidas ao cativeiro, esta manipulação ambiental é impraticável, pois é impossível simular os parâmetros ambientais requeridos por estas espécies, provavelmente devido à falta de conhecimento da ecofisiologia da reprodução dos peixes neotropicais.

Neste caso, muitas espécies de peixes são induzidas artificialmente à reprodução em cativeiro (manipulação hormonal), quando a terapia hormonal induz a maturação final, ovulação e desova, permitindo assim, a coleta artificial dos gametas para conduzir a fertilização artificial (Mylonas et al., 2010). As fêmeas de *S. parahybae* aptas à reprodução (para maiores detalhes, Capítulo 5) foram induzidas artificialmente, e assim, a migração nuclear para a periferia do oócito em direção ao pólo animal e os POFs foram observados. Esses eventos fisiológicos e morfológicos apresentados para as fêmeas induzidas de *S. parahybae* foram descritos em outras espécies de teleósteos induzidas artificialmente, sendo que, estes eventos só ocorrem de forma natural no ambiente natural (Bazzoli et al., 1996; Mylonas et al., 1997; Sato et al., 1998; Zohar & Mylonas, 2001; Romagosa et al., 2005; Honji et al., 2009b; Mylonas et al., 2010).

Os POFs originados após a ovulação são compostos pelas células foliculares e da teca, que após a liberação do oócito para o ambiente externo, permanecem no interior dos ovários depois da desova (Romagosa et al., 2005; Grier et al., 2009; Honji et al., 2009b). A permanência desta estrutura nos ovários após a desova varia entre as espécies, como por exemplo, em *P. fasciatum*, os POFs foram observados de zero a 24 horas após a ovulação (Romagosa et al., 2005), em *Oreochromis mossambicus* e em *O. mykiss*, os POFs podem persistir respectivamente por mais de 3 semanas e pelo menos 2 semanas após a desova (Grier et al., 2009), em *S. parahybae*, os POFs foram observados do momento zero até 48 horas após a extrusão dos gametas. De acordo com Selman & Wallace (1989) e Drummond et al. (2000), os POFs não apresentam função endócrina em teleósteos, e conseqüentemente, os POFs não podem ser considerados como homólogos ao corpo lúteo, encontrados em mamíferos. Entretanto, Grier et al. (2009) apontam que os POFs são fontes de hormônios esteróides sexuais, incluindo os estrógenos, com provável função na indução do próximo ciclo oogenético. Além da produção de estrógenos, Nagahama & Kagawa (1982) estudando os POFs de *O. rhodurus* (*in vitro*) concluem que os “jovens” POFs produzem progesterona em resposta a estimulação com gonadotropinas. Por fim, Chieffi & Chieffi-Baccari (1999, citado em Powell et al., 2006) e Koya et al. (2004) reportam que os POFs em algumas espécies são

responsáveis pela produção de esteróides sexuais. Em *S. parahybae* a provável ou não produção de esteróides sexuais pelos POFs será discutida abaixo.

Em fêmeas de *S. parahybae* que não foram induzidas artificialmente à reprodução em cativeiro, devido a não maturação final dos oócitos vitelogênicos, no final do período reprodutivo, estes oócitos sofreram atresia, ou seja, ocorreu o processo de degeneração e/ou remoção dos folículos ovarianos (Honji et al., 2006, 2009b; Rocha & Rocha, 2006; Grier et al., 2009). A caracterização dos oócitos atrésicos foi descrita em várias espécies de teleósteos (Miranda et al., 1999; Santos et al., 2005; Leonardo et al., 2006; Honji et al., 2006, 2009b; Rocha & Rocha, 2006; Lubzens et al., 2010). Apesar dos oócitos atrésicos serem identificados em qualquer estágio do ciclo reprodutivo (Honji et al., 2006, 2009b; Rocha & Rocha, 2006; Grier et al., 2009; e no presente estudo), segundo Blazer (2002), o processo de atresia é mais frequente durante o crescimento secundário e após a desova, quando os oócitos não ovulados, sofrem também o processo de atresia. Desta forma, ao final do período reprodutivo de *S. parahybae*, principalmente os oócitos vitelogênicos por não terem sido ovulados (liberados) sofreram atresia, caracterizando mais um estágio do ciclo reprodutivo desta espécie, o estágio regressão, devido principalmente à grande quantidade de oócitos atrésicos. Adicionalmente, o processo de apoptose é um mecanismo fundamental durante a regressão ovariana e atresia folicular, e também nos POFs, demonstrando a importância dos estudos neste tema em peixes (Miranda et al., 1999; Drummond et al., 2000; Wood & Van Der Kraak, 2001).

De maneira geral, o processo de maturação gonadal de *S. parahybae* não difere da maioria dos teleósteos que apresentam o desenvolvimento oocitário e desova do tipo sincrônico em grupo (Vazzoler, 1996; Rocha & Rocha, 2006). Entretanto, as fêmeas de *S. parahybae* que responderam positivamente à indução hormonal, apresentaram vários POFs nos ovários, alguns oócitos com migração nuclear e muitos oócitos vitelogênicos, estes últimos, provavelmente não responderam positivamente a esta indução hormonal. Neste caso, sugerem-se duas hipóteses: 1) o protocolo de indução hormonal aplicado (Capítulo 5) não foi muito efetivo na indução à ovulação de todos os oócitos vitelogênicos de *S. parahybae*; e 2) o desenvolvimento oocitário e desova do tipo sincrônico em grupo observado em *S. parahybae*, provavelmente é caracterizado por múltiplas desovas durante o período período. Para aceitar a primeira hipótese outros protocolos de indução hormonal precisam ser testados, assim como sugerido por Caneppele et al. (2009), que apresentam pela primeira vez a indução à reprodução de reprodutores selvagens de *S. parahybae* em cativeiro. A segunda hipótese foi baseada na estratégia reprodutiva descrita por Godinho et al. (2007) para outra espécie de Siluriformes, *P. corruscans*, que durante o período de desova, as fêmeas visitam o sítio de



desova várias vezes para desovar, sugerindo que esta espécie apresenta múltiplas desovas durante este período, o que poderia explicar a baixa liberação de oócitos induzidos artificialmente à reprodução em *S. parahybae* em estudos anteriores (Caneppele et al., 2009), e a presença de vários oócitos vitelogênicos nas fêmeas após a extrusão à seco dos gametas no presente estudo.

Por fim, os resultados das análises histológicas, levando em consideração principalmente as propostas de classificação ovariana descritas por Grier et al. (2009) e França et al. (2010) e o que foi discutido até agora, permitem dividir o ciclo reprodutivo de *S. parahybae* em 3 principais estádios de maturação, a saber: pré-vitelogênico, vitelogênico e regressão. Adicionalmente, a maturação final, ovulação e desova (presença de POFs) foram obtidas em *S. parahybae* apenas após a indução hormonal em cativeiro.

A análise dos esteróides sexuais permite estabelecer correlações entre o perfil destes hormônios e a morfofisiologia gonadal, que são essenciais para compreender o desenvolvimento ovariano. Durante o estágio pré-vitelogênico foi observada a maior concentração de E<sub>2</sub> plasmático em *S. parahybae*, possivelmente devido à estimulação das gonadotropinas (especialmente do hormônio folículo estimulante, FSH), sintetizado e liberado pela glândula hipofisária (Nagahama, 1994; Tyler & Sumpter, 1996; Goetz & Garczynski, 1997; Coward et al., 2002; Patiño & Sullivan, 2002; Strüssmann & Nakamura, 2002; Lubzens et al., 2010). Sugere-se que esta alta concentração plasmática de E<sub>2</sub> no estágio que antecede o crescimento secundário (ou vitelogênico) esteja relacionada à síntese de vitelogenina, pois uma das principais ações dos estrógenos é estimular a síntese da glicolipofosfoproteína (vitelogenina) no fígado, que por sua vez, é incorporada no oócito durante o crescimento secundário (Patiño & Sullivan, 2002; Lubzens et al., 2010). Altas concentrações plasmáticas de E<sub>2</sub> foram encontradas durante o crescimento primário, ou seja, em momentos que antecedem a presença de oócitos vitelogênicos e a ovulação, em várias espécies de teleósteos (Patiño & Sullivan, 2002; Estay et al., 2003; Modesto & Canário, 2003; Onuma et al., 2003; Lubzens et al., 2010), inclusive para espécies neotropicais (Gazola et al., 1996; Barcellos et al., 2001; Amaral et al., 2007; Arantes et al., 2010; França, 2010).

Adicionalmente, além desta função na estimulação da síntese de vitelogenina, os estrógenos participam no mecanismo de controle de proliferação de oogônias (em fêmeas) e espermatogônias (em machos) (Lubzens et al., 2010; Schulz et al., 2010). O perfil plasmático de E<sub>2</sub> no presente estudo sugere uma possível interação entre este estrógeno e a proliferação de oogônias, pois, os ninhos de oogônias foram identificados em maior número (observação qualitativa) durante o crescimento primário. Além disso, após a indução à reprodução, a

concentração plasmática deste esteróide não apresentou diferenças significativas nos diferentes tempos, entretanto, ocorreu um aumento de  $E_2$  no momento zero ( $1,10 \pm 0,13$  ng/ml), com valores próximos ao encontrado no estágio pré-vitelogênico ( $1,21 \pm 0,08$  ng/ml), provavelmente, esta resposta foi devido à indução hormonal exógena. Todos estes dados em relação ao  $E_2$ , também sugerem que após a indução hormonal, este estrógeno pode estar relacionado com a progressão das células germinativas durante a oogênese para o próximo período reprodutivo.

O  $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (*Maturation-Inducing hormone*, MIS) que tem o  $17\alpha$ -OHP como precursor, tem sido identificado como o hormônio indutor da maturação final e ovulação em várias espécies de teleósteos, e a ação deste progestágeno (MIS) induz a reativação da meiose nos oócitos vitelogênicos (Nagahama & Yamashita, 2008). Para a conversão de  $17\alpha$ -OHP em MIS, é realizada pela enzima  $20\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogenase ( $20\beta$ -HSD), sendo que, esta enzima é modulada pela ação do LH (Nagahama, 1997; Peter & Yu, 1997; Goetz & Garczynski, 1997; Strüssmann & Nakamura, 2002; Patiño & Sullivan, 2002; Coward et al., 2002; Lubzens et al., 2010). A concentração plasmática de  $17\alpha$ -OHP em *S. parahybae* não apresentou variação do estágio pré-vitelogênico para o estágio vitelogênico, sugerindo que a falha na maturação final nesta espécie é devido a uma disfunção nos progestágenos e/ou na enzima  $20\beta$ -HSD e/ou na síntese/liberação de LH. Em *S. hilarii*, um teleósteo neotropical, que também apresenta um bloqueio na reprodução quando os animais são submetidos ao sistema de cultivo (Honji et al., 2009b, 2011), o perfil hormonal de  $17\alpha$ -OHP (Amaral et al., 2007) também não apresenta variações nas concentrações plasmática de  $17\alpha$ -OHP, e estes autores, sugerem que em *S. hilarii* ocorre uma falha na enzima  $20\beta$ -HSD, impedindo a reprodução desta espécie em cativeiro. Neste caso, os dados obtidos de  $17\alpha$ -OHP sugerem que a disfunção na ovulação em espécies de peixes neotropicais em cativeiro, provavelmente possui a mesma base fisiológica.

Após a indução hormonal exógena e reprodução artificial em *S. parahybae*, os valores de  $17\alpha$ -OHP aumentam acentuadamente ( $\pm 17$  vezes) se comparado aos valores observados nos animais no estágio vitelogênico, desta forma, auxiliando na nossa hipótese de que, produção de  $17\alpha$ -OHP e a provável conversão de  $17\alpha$ -OHP em MIS não foi de forma eficiente. Adicionalmente, nós sugerimos uma análise específica na enzima  $20\beta$ -HSD e no MIS durante este período da reprodução no surubim do Paraíba para corroborar a nossa hipótese, além de uma análise também na enzima  $21\beta$ -hidroxilase, uma vez que, o  $17\alpha$ -OHP pode ser convertido em 11-deoxicortisol por esta enzima, ocasionando uma via preferencial na biosíntese dos corticosteróides devido às condições de estresse (Milla et al., 2009).

Em relação ao andrógeno 11-KT, a maioria das funções fisiológicas deste esteróide são estabelecidas em machos de teleósteos (revisões: Borg, 1994; Schulz et al., 2010) se comparados às fêmeas, no entanto, vários estudos detectaram a presença de altos valores deste esteróide em fêmeas sexualmente maduras, como por exemplo, nos salmonídeos, *O. kisutch* e *O. tshawytscha*, nos quais, os valores de 11-KT variaram respectivamente de 0,6 a 21,7 ng/ml e 0,1 a 20 ng/ml durante o ciclo reprodutivo (Fitzpatrick et al., 1986; Slater et al., 1994), em fêmeas de duas espécies de enguias (*Anguilla dieffenbachii* e *A. australis*), coletadas antes e na entrada da migração reprodutiva natural, os valores de 11-KT variaram respectivamente de 0,1 a 2,8 ng/ml<sup>-1</sup> e 0,1 a 22,7 ng/ml<sup>-1</sup> (Lokman et al., 1998), e em algumas espécies neotropicais, como em *Arapaima gigas*, o 11-KT variou de 6,4 a 71,5 pg/ml também durante o ciclo reprodutivo de fêmeas em cativeiro (Amaral, 2009); em *G. sylvius*, nos quais, este esteróide variou de 14,6 a 19,8 pg/ml no ambiente natural (França, 2010); em fêmeas de *R. quelen* (máximo de 94,4 ng/ml) durante o primeiro ciclo reprodutivo (Barcellos et al., 2001). No presente estudo a concentração de 11-KT também variou durante o ciclo reprodutivo, com maior concentração plasmática no estágio vitelogênico, sugerindo um importante papel fisiológico durante a maturação gonadal do surubim do Paraíba, no entanto, o sítio de síntese (provavelmente nas células foliculares), o sítio de ação e a (s) possível (is) função (ões) ainda permanece (m) desconhecido (s) durante este período. Adicionalmente, após a indução à reprodução, as fêmeas de *S. parahybae* apresentaram um pico de 11-KT, seguido de uma queda após a extrusão dos gametas, sugerindo um importante papel deste andrógeno também durante a maturação final e ovulação.

Os andrógenos são importantes durante a oogênese, não apenas por serem precursores na biosíntese dos estrógenos, mas também controlam o desenvolvimento oocitário, pois, a identificação de receptores de andrógenos nos ovários vitelogênicos de várias espécies de peixes foi caracterizada, como por exemplo, em *Micropogonias undulates* (Braun & Thomas, 2003, 2004) e em *A. japonica* (Tosaka et al., 2010). A presença de receptores de andrógenos em ovários e a elevada concentração de 11-KT em fêmeas (supracitados) suportam a idéia de que os andrógenos participam no controle da maturação sexual em teleósteos (Matsubara et al., 2005), principalmente no crescimento primário e também nas fases posteriores da oogênese. Além da influência de 11-KT na reprodução, este andrógeno parece estar envolvido no comportamento migratório de peixes teleósteos (Munakata & Kobayashi, 2010; Sudo et al., 2011), na estimulação do sistema dopaminérgico, que também estão relacionados com a reprodução e em vários tipos de comportamento (*i.e.*, mudanças de sexo) (Weltzien et al., 2006; Godwin, 2010), na modulação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (eixo responsável

pelas respostas ao estresse) (Fuzzen et al., 2011), e em outros hormônios protéicos, *i.e.*, hormônios da tireóide, que também modula a migração em salmonídeos e também está relacionado com a metamorfose em Pleuronectiformes (Weltzien et al., 2004; Sudo et al., 2011).

O mesmo perfil de 11-KT foi observado para T durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae*, ou seja, altas concentrações plasmáticas foram identificadas em fêmeas no estágio vitelogênico, se comparado aos estádios pré-vitelogênico e regressão. A T além de ser utilizada como substrato para a síntese de E<sub>2</sub> e de 11-KT (Borg, 1994; Matsubara et al., 2005; Norris, 2007), também desempenha um papel muito importante no *feedback* no eixo cérebro-hipófise-gônadas (Lokman et al., 2002; Matsubara et al., 2003). Estas vias de conversão sugerem que no estágio vitelogênico tenha ocorrido uma preferência pela produção de 11-KT a partir de T, ao invés de E<sub>2</sub> que já se encontrava em concentrações mais baixas, provavelmente devido ao término da fase de crescimento oocitário.

Por fim, nós concluímos que durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae*, em cativeiro, os oócitos apresentam um crescimento primário e secundário satisfatório. Entretanto, ocorre uma falha na maturação final, ovulação e desova nos reprodutores de *S. parahybae* neste ambiente, evidenciando que o cativeiro afeta severamente a reprodução do surubim do Paraíba, o que sugere uma análise específica no controle endócrino da maturação final, ou seja, no eixo cérebro-hipófise. Adicionalmente, os perfis plasmáticos de E<sub>2</sub> e T durante o ciclo reprodutivo foram fundamentais no desenvolvimento oocitário e parece que estes esteróides sexuais não estão envolvidos no bloqueio da reprodução em espécies migradoras de teleósteos quando em operações de cultivo. Por outro lado, os valores de 17 $\alpha$ -OHP durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução, sugerem que a falha na maturação final, ovulação e desova esteja relacionada com uma disfunção nos progestágenos, principalmente na produção do MIS. Desta forma, o desenvolvimento de protocolos de imunoenaios para 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one para espécies reofílicas quando confinados em cativeiro, pode ser uma ferramenta valiosa para o entendimento desta (s) disfunção (ões) da reprodução. Finalmente, o completo entendimento do eixo cérebro-hipófise-gônadas, assim como as enzimas envolvidas nas vias esteroidogênicas podem auxiliar nos protocolos de indução artificial à reprodução, que são conhecimentos essenciais na piscicultura de conservação, inclusive para *S. parahybae*, uma espécie neotropical ameaçada de extinção.

## 5. Agradecimentos

Os autores agradecem à Dra. Irani Quagio-Grassiotto e todos os integrantes de seu laboratório (IBB-UNESP) por auxiliarem nas preparações histológicas. Os autores também agradecem a CESP e a seus funcionários pelo auxílio nas instalações e manutenção dos reprodutores em cativeiro. Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo: 2007/55494-7 e 2008/57687-0).

## 6. Referências bibliográficas

- Agostinho, A. A.; Gomes, L. C. & Pelicice, F. M. 2007. Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. EDUEM, Maringá. 501p.
- Agostinho, A. A.; Miranda, L. E.; Bini, L. M.; Gomes, L. C.; Thomaz, S. M. & Suzuki, H. I. 1999. Patters of colonization in neotropical reservoirs and prognoses on aging. Pp: 227-265. In: Tundisi, J. G. & Straskraba, M. (Eds.). Theoretical reservoir ecology and its applications. Backhuys/International Institute of Ecology, São Carlos.
- 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.
- 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. Comp. Biochem. Physiol. 148A (Suppl. 1): S44.
- ANEEL. 2006. Formação de um banco de germoplasma da ictiofauna ameaçada da Bacia do Rio Paraíba do Sul. ANEEL (0061-017/2006).
- Arantes, F. P.; Santos, H. B.; Rizzo, E.; Sato, Y. & Bazzoli, N. 2010. Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brasil. Anim. Reprod. Sci. 118: 330-336.
- Barcellos, L. J. G.; Wassermann, G. F.; Scott, A. P.; Woehl, V. M.; Quevedo, R. M.; Itzés, I.; Krieger, M. H. & Lulhier, F. 2001. Steroid profile in cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. Gen. Comp. Endocrinol. 121: 325-332.
- Bazzoli, N.; Rizzo, E.; Santos, J. E. & Sato, Y. 1996. Dinâmica da ovogênese em peixes forrageiros da represa de Três Marias, Minas Gerais: estudo histológico e histoquímico. Bios. 4(4): 5-10.

- Behmer, O. A.; Tolosa, E. M. C. & Neto, A. G. F. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART, São Paulo, Livraria Editora Ltda. 239p.
- Blazer, V. S. 2002. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 26: 85-101.
- Bobe, J. & Labbé, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 535-548.
- Borg, B. 1994. Androgens in teleost fishes. Mini review. *Comp. Biochem. Physiol.* 109C: 219-245.
- Brasil. 2004. Instrução normativa N° 05 de 21 de maio de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Ministério do Meio Ambiente.
- Braun, A. M. & Thomas, P. 2003. Androgens inhibit estradiol-17 $\beta$  synthesis in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) ovaries by a nongenomic mechanism initiated at the cell surface. *Biol. Reprod.* 69: 1642-1650.
- Braun, A. M. & Thomas, P. 2004. Biochemical characterization of a membrane androgen receptor in the ovary of the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) *Biol. Reprod.* 71: 146-155.
- Brooks, S.; Tyler, C. R. & Sumpter, J. P. 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Rev. Fish Biol. Fisher.* 7: 387-416.
- Brown-Peterson, N. J.; Lowerre-Barbieri, S. K.; Macewicz, B. J.; Saborido-Rey, F.; Tomkiewicz, J. & Wyanski, D. M. 2009. An improved and simplified terminology for reproductive classification in fishes. Gulf Coast Research Laboratory <[http://www.usm.edu/gcrl/research/gonadal\\_terminology.php](http://www.usm.edu/gcrl/research/gonadal_terminology.php)> Acessado em: 10/06/2011.
- Caneppele, D.; Honji, R. M.; Hilsdorf, A. W. & Moreira, R. G. 2009. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotrop. Ichthyol.* 7(4): 759-762.
- CESP (Companhia Energética de São Paulo). 2006. 40 Peixes do Brasil. CESP 40 anos. Rio de Janeiro, Doiis, 208p.
- Correia, T. G.; Narcizo, A. M.; Bianchini, A. & Moreira, R. G. 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 151C: 461-466.
- Coward, K.; Bromage, N. R.; Hibbitt, O. & Parrington, J. 2002. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 12: 33-58.

- Desjardins, J. K.; Hazelden, M. R.; Van der Kraak, G. J. & Balshine, S. 2005. Male and female cooperatively breeding fish provide support for the “Challenge hypothesis”. *Behav. Ecol.* 17: 149-154.
- Dias, J. F.; Peres-Rios, E.; Chaves, P. T. C. & Rossi-Wongtschowski, C. L. D. B. 1998. Análise macroscópica dos ovários de teleósteos: problemas de classificação e recomendações de procedimentos. *Rev. Brasil. Biol.* 58(1): 55-69.
- Drummond, C. D.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. & Sato, Y. 2000. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. *J. Exp. Zool.* 287: 176-182.
- 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. *J. Exp. Zool.* 298: 60-66.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2010. The state of world fisheries and aquaculture. Rome. 197p.
- 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. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62: 437-451.
- França, G. F. 2010. Caracterização do epitélio germinativo das fêmeas e machos de *Gymnotus* sp., e perfil hormonal durante o ciclo reprodutivo (Teleostei, Ostariophysi, Gymnotiformes). Tese de doutorado. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. 140p.
- França, G. F.; Grier, H. J. & Quagio-Grassiotto, I. 2010. A new vision of the origin and the oocyte development in the ostariophysi applied to *Gymnotus sylvius* (Teleostei, Gymnotiformes). *Neotropic. Ichthyol.* 8(4): 787-804.
- Fuzzen, M. L. M.; Bernier, N. J. & Van der Kraak, G. 2011. Differential effects of 17 $\beta$ -estradiol and 11-ketotestosterone on the endocrine stress response in zebrafish (*Danio rerio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 170: 365-373.
- Garavello, J. C. 2005. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropic. Ichthyol.* 3(4): 607-623.
- Gazola, R.; Borella, M. I.; Donaldson, E. M.; Val-Sella, M. V.; Sukumasavin, N.; Fava-de-Moraes, F. & Bernardino, G. 1996. Plasma steroid and corticosteroid levels in female pacu *Piaractus mesopotamicus*, Teleostei-Characidae. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 659-664.

- Ghiraldelli, L.; Machado, C.; Fracalossi, D. M. & Zaniboni-Filho, E. 2007. Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região sul do Brasil. *Acta Sci. Biol. Sci.* 29(4): 349-356.
- Godinho, A. L.; Kynard, B. & Godinho, H. P. 2007. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco River, Brazil. *Environ. Biol. Fish.* 80: 421-433.
- Godwin, J. 2010. Neuroendocrinology of sexual plasticity in teleost fishes. *Front. Neuroendocrin.* 31: 203-216.
- Goetz, F. W. & Garczynski, M. 1997. The ovarian regulation of ovulation in teleost fish. *Fish Physiol. Biochem.* 17: 33-38.
- Grier, H. J. 2000. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J. Morphol.* 243: 265-281.
- Grier, H. J.; Uribe, M. C. & Parenti, L. R. 2007. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). *J. Morphol.* 268: 293-310.
- Grier, H. J.; Uribe, M. C. & Patiño, R. 2009. The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleosts. Pp: 25-84. In: Jamieson, B. G. M. (Ed.). *Reproductive Biology and Phylogeny of fishes (Agnathans and Bony Fishes)*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers.
- Harvey, B. & Carolsfeld, J. 1993. *Induced breeding in tropical fish culture*. International Development Research Centre. Ottawa, Canada. 144p.
- Honji, R. M.; Caneppele, D.; Hilsdorf, A. W. S. & Moreira, R. G. 2009a. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). *Environ. Biol. Fish.* 85(3): 207-208.
- Honji, R. M.; Mello, P. H.; Araújo, B. C.; Rodrigues-Filho, J. A.; Hilsdorf, A. W. S. & Moreira, R. G. 2011. Influence of spawning procedure on gametes fertilization success in *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae): implications for the conservation of this species. *Neotrop. Ichthyol.* 9(2): 363-370.
- Honji, R. M.; Narcizo, A. M.; Borella, M. I.; Romagosa, E. & Moreira, R.G. 2009b. Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). *Fish Physiol. Biochem.* 35: 109-123.
- Honji, R. M.; Vaz-dos-Santos, A. M.; Rossi-Wongtschowski, C. L. D. B. 2006. Identification of the stages of ovarian maturation of the argentine hake *Merluccius hubbsi* Marini,



- 1933 (Teleostei: Merlucciidae): advantages and disadvantages of the use of the macroscopic and microscopic scales. *Neotrop. Ichthyol.* 4: 329-337.
- Hostim-Silva, M.; Bertoncini, A. A.; Gerhardinger, L. C. & Machado, L. F. 2005. The lord of the rocks conservation program in Brazil: the need for a new perception of marine fishes. *Coral Reefs.* 24: 74.
- von Ihering, R. & Azevedo, P. 1934. A curimatã dos açudes nordestinos (*Prochilodus argenteus*). *Arch. Inst. Biol.* 5(5): 143-184.
- von Ihering, R. & Azevedo, P. 1936. A desova e a hipofiseação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. *Arch. Inst. Biol.* 7(9): 107-180.
- IUCN. 2011. Red list of threatened species. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 19/06/2011.
- Koya, Y.; Mori, H. & Nakagawa, M. 2004. Serum 17, 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels in pregnant and non-pregnant female rockfish, *Sebastes schlegeli*, viviparous teleost and its production by post-ovulatory follicles. *Zool. Sci.* 21: 565-573.
- Kunkel, L. H. & Flores, S. 1996. Estructura histologica de los ovarios de *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829), Pimelodidae, Siluriformes. *Bol. Inst. Pesca.* 23: 203-212.
- Kunz, Y. R. 2004. Developmental biology of teleost fishes. *Fish & Fisheries.* Springer. 636p.
- Leonardo, A. F. G.; Romagosa, E.; Batlouni, S. R. & Borella, M. I. 2006. Occurrence and significance of ovarian and follicular regression in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766): a histology approach. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58(5): 831-840.
- Leonardo, A. F. G.; Romagosa, E.; Borella, M. I. & Batlouni, S. R. 2004. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). *Aquaculture* 240: 451-461.
- 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. *Gen. Comp. Endocrinol.* 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 dieffenbachii* and *A. australis*) before and at the onset of the natural spawning migration. I. females. *Fish Physiol. Biochem.* 19: 325-338.
- Lubzens, E.; Young, G.; Bobe, J. & Cerdà, J. 2010. Oogenesis in teleost: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 367-389.

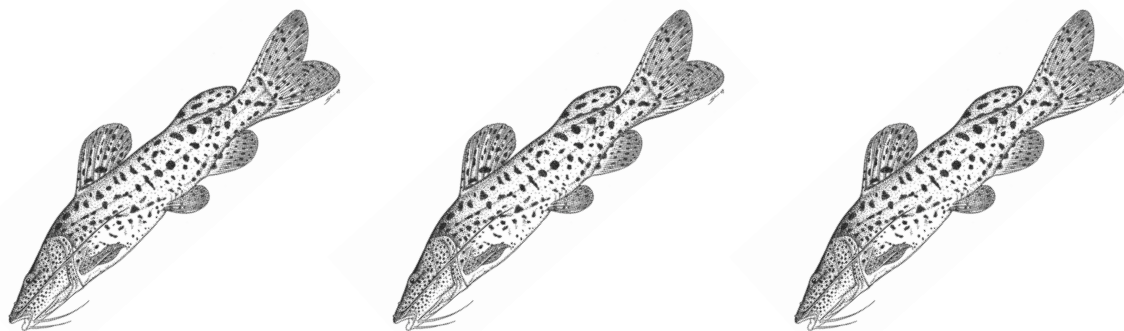
- Ludwig, L. A. M.; Gomes, E. & Artoni, R. F. 2005. Um método de reprodução induzida para o surubim *Steindachneridion melanodermatum* (Siluriformes, Pimelodidae) do Rio Iguçu. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa. 11(3/4): 23-27.
- Marques, C.; Nakaghi, L. S.; Faustino, F.; Ganeco, L. N. & Senhorini, J. A. 2008. Observation of the embryonic development in *Pseudoplatystoma coruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) under light and scanning electron microscopy. *Zygote*. 16: 333-342.
- 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 Physiol. Biochem.* 28: 353-354.
- Mazzoni, T. S.; Grier, H. J. & Quagio-Grassiotto, I. 2010. Germinative cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostiophysi: Cypriniformes). *Ant. Rec.* 293: 1581-1606.
- Milla, S.; Wang, N.; Mandiki, S. N. M. & Kestemont, P. 2009. Corticosteroids: friends or foes of teleost fish reproduction? *Comp. Biochem. Physiol.* 153A: 242-251.
- Miranda, A. C.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. & Sato, Y. 1999. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. *Tissue & Cell* 31: 480-488.
- Modesto, T. & Canário, A. V. M. 2003. Morphometric changes and sex steroid levels during the annual reproductive cycle of the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 131: 220-231.
- Moyle, P. B. & Cech, J. J. 2003. *Fishes. An introduction to ichthyology*. Prentice Hall, Upper Saddle River. New Jersey. 590p.
- Munakata, A. & Kobayashi, M. 2010. Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 456-468.
- Mylonas, C. C.; Fostier, A. & Zanuy, S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 516-534.
- Mylonas, C. C.; Magnus, Y.; Gissis, A.; Klebanov, Y. & Zohar, Y. 1997. Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass. *J. Fish Biol.* 51: 234-250.

- Nagahama, Y. & Kagawa, H. 1982. In vitro steroid production in the postovulatory follicles of the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, in response to salmon gonadotropin. J. Exp. Zool. 219: 105-109.
- Nagahama, Y. & Yamashita, M. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. Dev. Growth Differ. 50 (suppl. 1): S195-219.
- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. Pp: 223-275. In: Hoar, W. S.; Randall, D. J. & Donaldson, E. M. (Eds.). Fish Physiology. vol. IX.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Int. J. Dev. Biol. 38: 217-229.
- Nagahama, Y. 1997.  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. Steroids 62: 190-196.
- 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. Gen. Comp. Endocrinol. 133: 199-215.
- Ottolenghi, F.; Silvestri, C.; Giordano, P.; Lovatelli, A. & New, M. B. 2004. Capture-based aquaculture. The fattening of eels, groupers, tunas and yellowtails. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 308p.
- Parenti, L. R. & Grier, H. J. 2004. Evolution and phylogeny of gonadal morphology in bony fishes. Integr. Comp. Biol. 44: 333-348.
- Patiño, R. & Sullivan, C. V. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. Fish Physiol. Biochem. 26: 57-70.
- Peter, R. E. & Yu, K. L. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basics applied aspects. Rev. Fish Biol. Fisher. 7: 173-197.
- Powell, M. L.; Kavanaugh, S. & Sower, S. A. 2006. Identification of a functional corpus luteum in the Atlantic hagfish *Myxine glutinosa*. Gen. Comp. Endocrinol. 148: 95-101.
- Quagio-Grassiotto, I.; Grier, H.; Mazzoni, T. S.; Nóbrega, R. H. & Amorim, J. P. A. 2011. Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysii: Siluriformes): germine cysts, follicle formation and oocyte development. J. Morphol. (online: 31/05/2011).
- Quintero-Hunter, I.; Grier, H. J. & Muscato, M. 1991. Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. Biotech. Histochem. 66: 169-172.

- Ravaglia, M. A. & Maggese, M. C. 2002. Oogenesis in the swamp eel *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795) (Teleostei; Synbranchidae). Ovarian anatomy, stages of oocyte development and micropyle structure. *Biocell* 26(3): 325-337.
- Ricardo, M. C. P.; Aguiar, C. A.; Rizzo, E. & Bazzoli, N. 1996. Morfologia da micrópila e da célula micropilar em teleósteos neotropicais de água doce. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 48(1): 17-24.
- Rizzo, E.; Godinho, H. P. & Sato, Y. 2003. Short-term storage of oocytes from the Neotropical teleost fish *Prochilodus marggravii*. *Theriogenology* 60: 1059-1070.
- Rizzo, E.; Moura, T. F. C.; Sato, Y. & Bazzoli, N. 1998. Oocyte surface in four teleost fish species postspawning and fertilization. *Bras. Arch. Biol. Technol.* 41(1): 37-48.
- Rocha, M. J. & Rocha, E. 2006. Morphofunctional aspects of reproduction from synchronous to asynchronous fishes – An overview. Pp: 570-624. In: Reinecke, M.; Zaccane, G. & Kappor, B.G. (Eds.). *Fish Endocrinology*. Science Publishers. vol. 2.
- Romagosa, E.; Batlouni, S. R.; Borella, M. I. & Leonardo, A. F. G. 2005. Involução dos folículos pós-ovulatórios em *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pisces, Teleostei). *Bol. Inst. Pesca.* 31(2): 129-135.
- Romagosa, E.; Paiva, P.; Andrade-Talmelli, E. F. & Godinho, H. M. 2003. Biologia reprodutiva de fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae), mantidas em cativeiro. *Bol. Inst. Pesca.* 29: 151-159.
- Rosa, R. S. & Lima, F. C. T. 2008. Peixes. Pp: 9-275. In: Machado, A. B. M.; Drummond, G. M. & Paglia, A. P. (Eds.). *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*. Biodiversidade 19. Brasília, DF.
- 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. *J. Fish Biol.* 67: 1446-1459.
- Sarasquete, C.; Cárdenas, S.; González de Canales, M. L. & Pascual, E. 2002. Oogenesis in the bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L.: a histological and histochemical study. *Histol. Histopathol.* 17: 775-788.
- Sato, Y.; Fenerich-Verani, N.; Verani, J. R.; Godinho, H. P. & Sampaio, E. V. 1998. Induced reproduction and reproductive characteristics of *Rhinelepis aspera* Agassiz, 1829 (Osteichthyes: Siluriformes, Loricariidae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 41(3): 309-314.
- Schulz, R. W.; França, L. R.; Lareyre, J.; LeGac, F.; Chiarini-Garcia, H.; Nóbrega, R. H. & Miura, T. 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 390-411.

- Selman, K. & Wallace, R. A. 1989. Review cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool. Sci.* 6: 211-231.
- Shibata, Y.; Iwamatsu, T.; Oba, Y.; Kobayashi, D.; Tanaka, M.; Nagahama, Y.; Suzuki, N. & Yoshikuni, M. 2000. Identification and cDNA cloning of alveolin, and extracellular metalloproteinase, which induces chorion hardening of medaka (*Oryzias latipes*) eggs upon fertilization. *J. Biol. Chem.* 275: 8349-8354.
- 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*). *Comp. Biochem. Physiol.* 109A: 167-175.
- Strüssmann, C. A. & Nakamura, M. 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 26: 13-29.
- Sudo, R.; Suetake, H.; Suzuki, Y.; Utoh, T.; Tanaka, S.; Aoyama, J. & Tsukamoto, K. 2011. Dynamics of reproductive hormones during downstream migration in females of the Japanese eel, *Anguilla anguilla*. *Zool. Sci.* 28: 180-188.
- 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. *Gen. Comp. Endocrinol.* 168: 424-430.
- Tyler, C. R. & Sumpter, J. P. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 6: 287-318.
- Vazzoler, A. E. A. M. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.* EDUEM, Maringá. 169p.
- Wallace, R. A. & Selman, K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleost. *Am. Zool.* 21: 325-343.
- Weltzien, F.; Andersson, E.; Andersen, O.; Shalchian-Tabrizi, K. & Norberg, B. 2004. The brain-pituitary-gonads axis in male teleost, with special on flatfish (Pleuronectiformes). *Comp. Biochem. Physiol.* 137A: 447-477.
- Weltzien, F.; Pasqualini, C.; Sébert, M.; Vidal, B.; Belle, N. L.; Kah, O.; Vernier, P. & Dufour, S. 2006. Androgen-dependent stimulating of brain dopaminergic systems in the female European eel (*Anguilla anguilla*). *Endocrinology* 147: 2964-2973.
- West, G. 1990. Methods of assessing ovarian development in fish: a review. *Aust. J. Mar. Fresh Res.* 41: 199-222.

- 
- Wilson, E. O. 1988. The current stage of biological diversity. National Academy Press, Washington, D. C. 538p.
- Wood, A. W. & Van Der Kraak, G. J. 2001. Apoptosis and ovarian function: novel perspectives from the teleosts. *Biol. Reprod.* 64: 264-271.
- Wootton, R. J. 1990. Ecology of teleost fishes. London – New York. Chapman and Hall. 404p.
- Zar, J. H. 2010. Biostatistical analysis. New Jersey. Prentice Hall. 718p.
- Zavala-Camin, L. A. 2004. O planeta água e seus peixes. Edição do Autor. 326p.
- Zohar, Y. & Mylonas, C. C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99-136.



**TABELAS: CAPÍTULO 2**







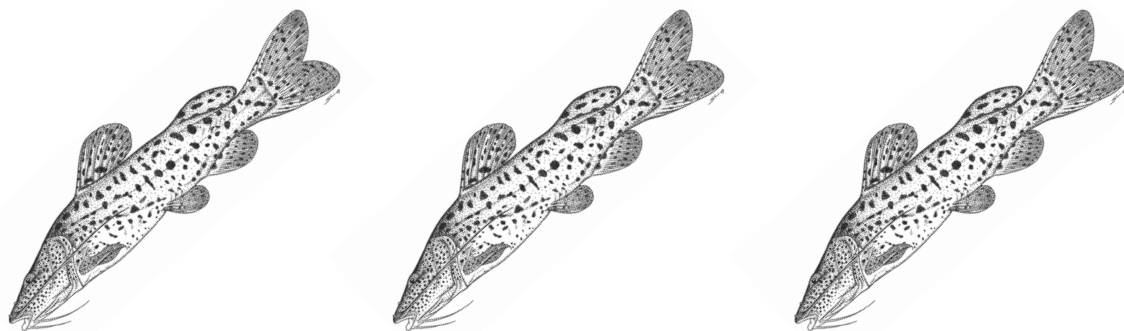
**Tabela 1.** *Steindachneridion parahybae* – Distribuição morfométrica e ponderal e Índice Gonadossomático (IGS) por estágio de maturação. Média  $\pm$  erro padrão da média.

Estádio de maturação	N	Comprimento padrão (cm): min-max	Comprimento padrão média (cm)	Massa corpórea média (g)	IGS
Pré-vitelogênico	28	29,00 - 40,50	35,93 $\pm$ 0,64	698,52 $\pm$ 29,50	0,40 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>
Vitelogênico	22	29,50 - 40,50	34,50 $\pm$ 0,55	596,66 $\pm$ 25,35	1,59 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>
Regressão	18	30,00 - 38,50	33,61 $\pm$ 0,46	603,85 $\pm$ 29,97	0,57 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
Reprodução*	24	31,50 - 37,00	33,40 $\pm$ 0,24	555,70 $\pm$ 13,14	1,54 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes.

\* Valores referentes das fêmeas no momento da indução artificial à reprodução.

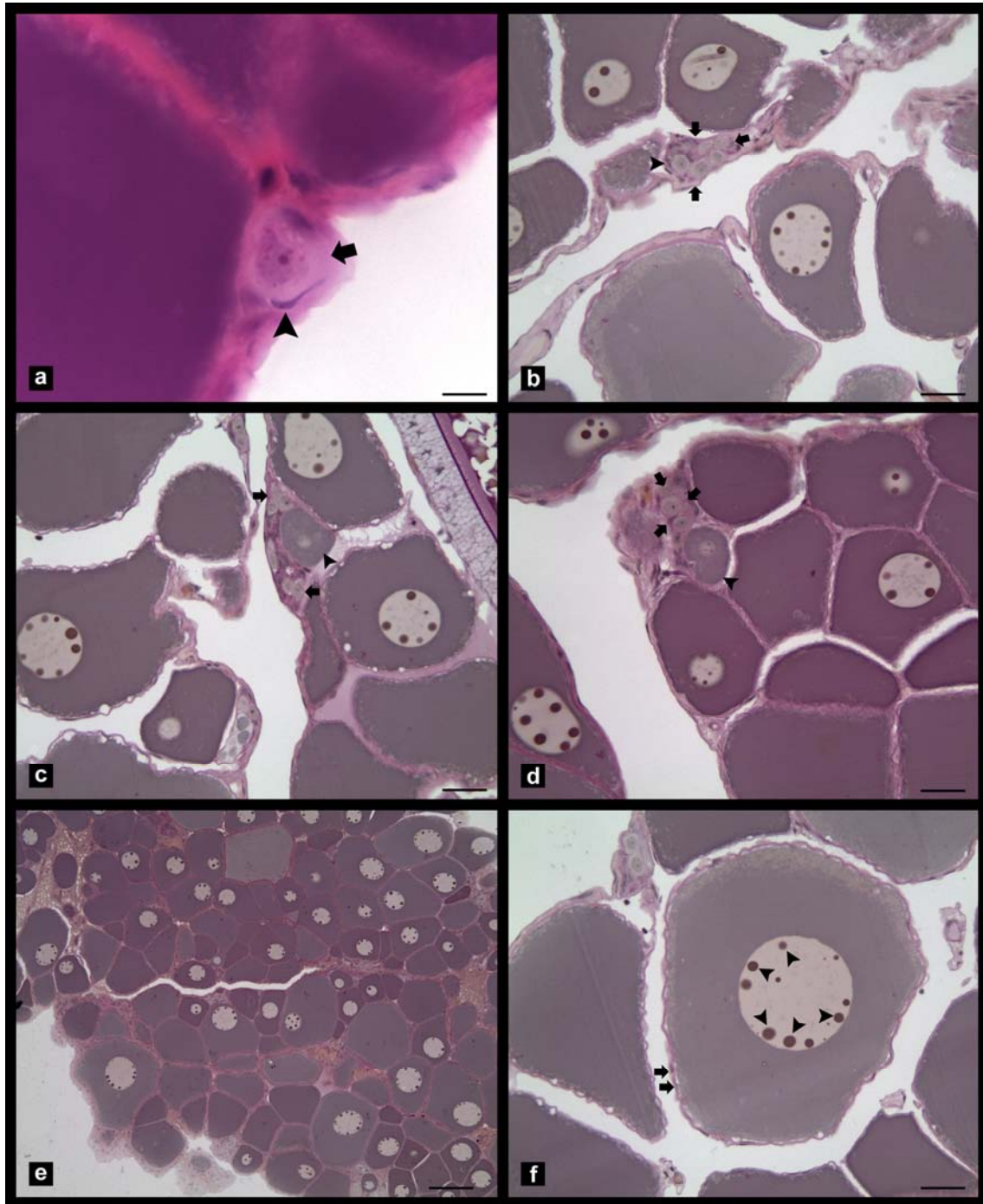




**FIGURAS: CAPÍTULO 2**



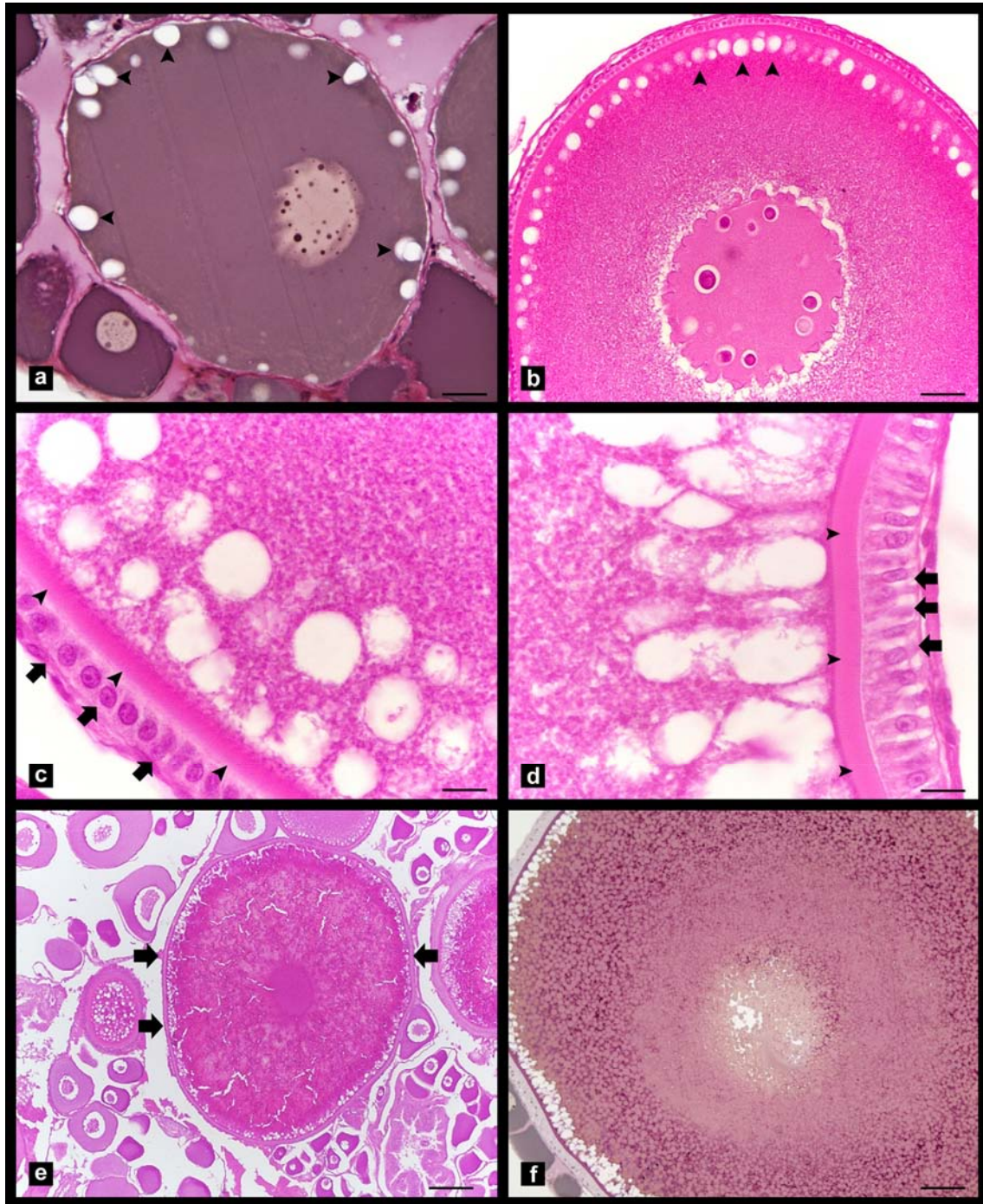




**Fig. 1.** *Steindachneridion parahybae* (exemplar no estágio de desenvolvimento gonadal: pré-vitelogênico): Desenvolvimento folicular e oocitário durante o ciclo reprodutivo do surubim do Paraíba. a, b) As oogônias (setas) são células pequenas e desenvolvem-se em ninhos (delimitado pelas setas), e periféricamente são observadas as células pré-foliculares (cabeça de seta); c, d) As oogônias (setas) entram em processo de meiose, originando oócitos (cabeça de seta) que se separam dos ninhos; e, f) Oócitos perinucleolares em pleno desenvolvimento e

---

em diferentes fases de desenvolvimento (e). Detalhe de um oócito perinucleolar (f), apresentando os múltiplos nucléolos (cabeças de seta) e uma fina camada folicular (setas). Ácido periódico de Schiff (PAS) + hematoxilina + *Metanil Yellow*. Barra: 10  $\mu\text{m}$  (a); 30  $\mu\text{m}$  (b; c; d; f) e 400  $\mu\text{m}$  (e).

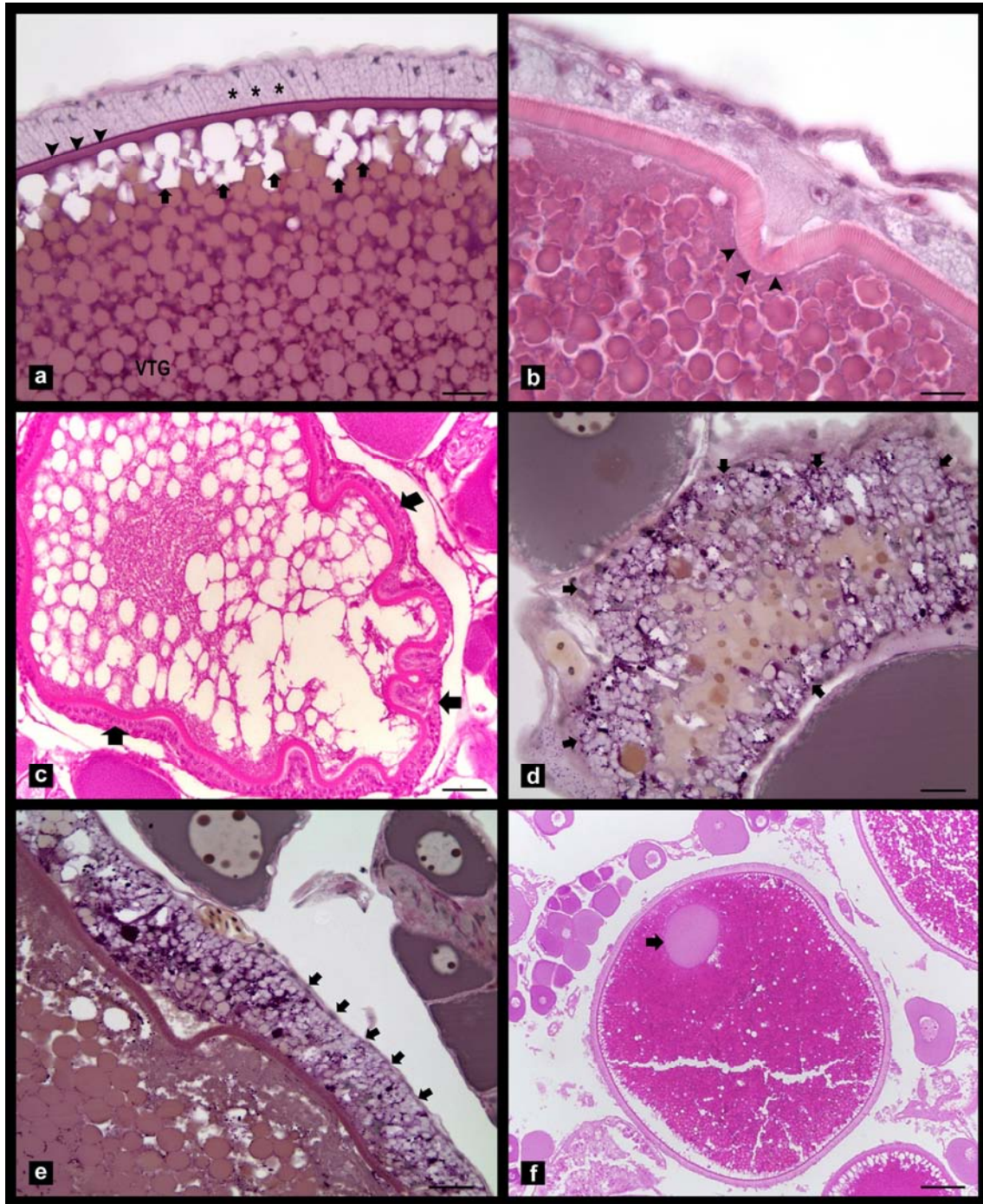


**Fig. 2.** *Steindachneridion parahybae* (exemplares nos estádios de desenvolvimento gonadal: pré-vitelogênico (a, b) e vitelogênico (c-f)): Desenvolvimento folicular e oocitário durante o ciclo reprodutivo do surubim do Paraíba. a, b) Oócito alvéolo cortical. Deposição de alvéolos corticais na periferia dos oócitos (cabeças de seta); c) Oócito alvéolo cortical. Detalhamento da camada folicular (setas) e a zona pelúcida (cabeças de seta); d) Oócito alvéolo cortical. Zona pelúcida (cabeças de seta) e hipertrofia da camada folicular (setas); e, f) Oócitos

---

vitelgênicos. Ácido periódico de Schiff (PAS) + hematoxilina + *Metanil Yellow* (a; f). Hematoxilina e eosina (b; c; d; e). Barra: 30 $\mu$ m (a), 20 $\mu$ m (c; d), 100 $\mu$ m (b; f) e 300 $\mu$ m (e).

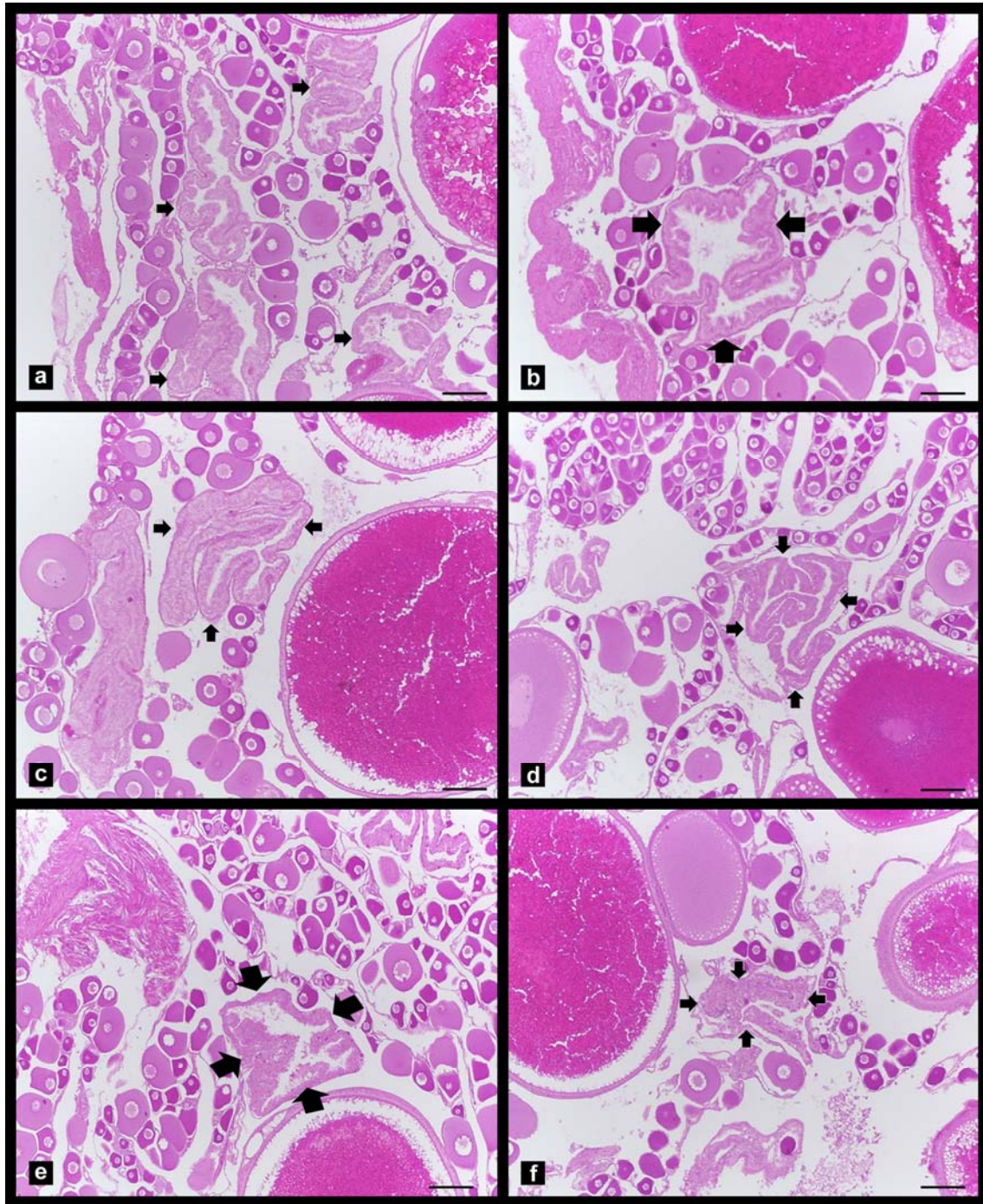




**Fig. 3.** *Steindachneridion parahybae* (exemplares nos estádios de desenvolvimento gonadal: vitelogênico (a, b) e regressão (c-e) e exemplar induzido à reprodução artificial (f)): Desenvolvimento folicular e oocitário durante o ciclo reprodutivo do surubim do Paraíba. a) Oócito vitelogênico. Detalhamento da zona pelúcida (cabeças de seta), hipertrofia da camada folicular (asteriscos), deslocamento do alvéolo cortical para a periferia do oócito (setas) e grânulos de vitelo (VTG); b) Oócito vitelogênico. Detalhamento da micrópila (cabeças de

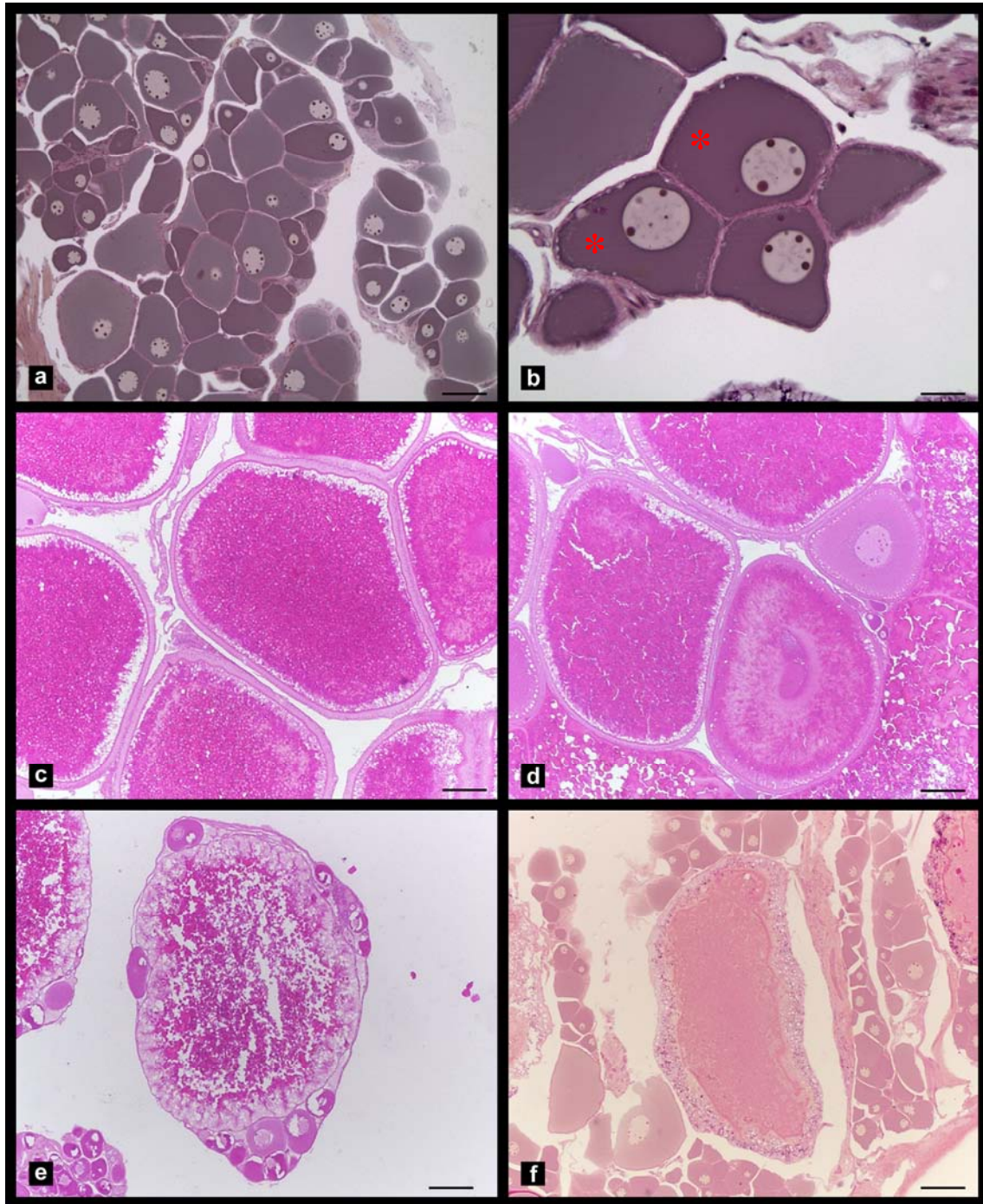
---

seta); c, d, e) Oócitos atrésicos em diferentes fases de degeneração. Desorganização parcial (c) e avançada (d) do oócito atrésico (setas). Detalhamento da desorganização da camada folicular (e) do oócito atrésico (setas); f) Oócitos vitelogênicos com migração celular (seta) para a periferia do oócito em direção à micrópila. Ácido periódico de Schiff (PAS) + hematoxilina + *Metanil Yellow* (a; d; e). Hematoxilina e eosina (b; c; f). Barra: 30 $\mu$ m (a; e), 10 $\mu$ m (b), 100 $\mu$ m (c; d) e 200 $\mu$ m (f).



**Fig. 4.** *Steindachneridion parahybae* (exemplares induzidos à reprodução artificial): Desenvolvimento folicular e oocitário durante o ciclo reprodutivo do surubim do Paraíba. a-f) Caracterização dos folículos pós-ovulatórios (setas) após a indução hormonal artificial em diferentes intervalos de tempo. a) Momento zero após a ESG; b) 6 horas após a ESG; c) 12 horas após a ESG; d) 24 horas após a ESG; e) 36 horas após a ESG; f) 48 horas após a ESG. Hematoxilina e eosina. Barra: 300 $\mu$ m.

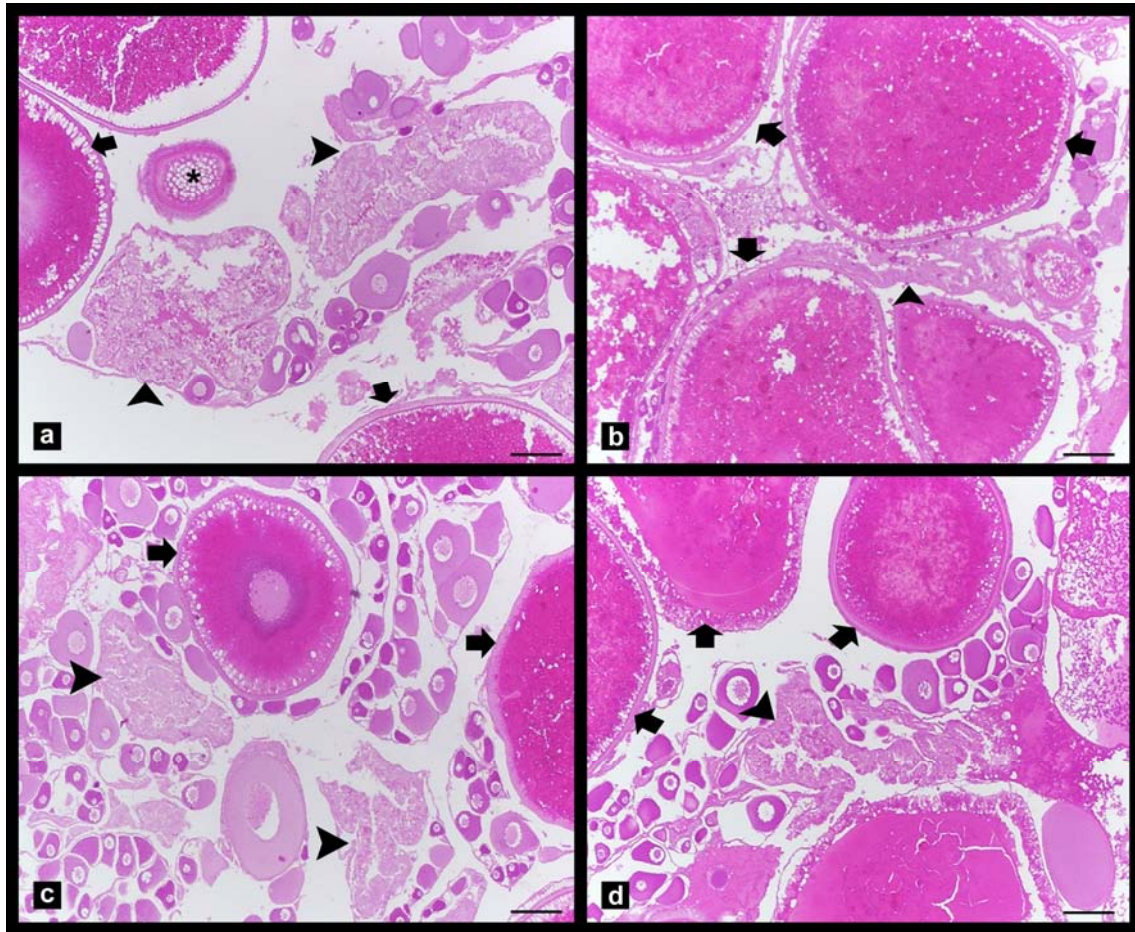




**Fig. 5.** *Steindachneridion parahybae*: Caracterização do ciclo reprodutivo do surubim do Paraíba. a, b) Estádio pré-vitelogênico. Presença de maior número de oócitos perinucleolares (a) e alguns alvéolos corticais iniciais (asterisco, (b)). c, d) Estádio vitelogênico. Presença de maior número de oócitos vitelogênicos (c, d) e poucos alvéolos corticais (d); e, f) Estádio regressão. Presença de alguns oócitos perinucleolares e de maior número de oócitos atresicos em diferentes fases de degeneração. Ácido periódico de Schiff (PAS) + hematoxilina +

---

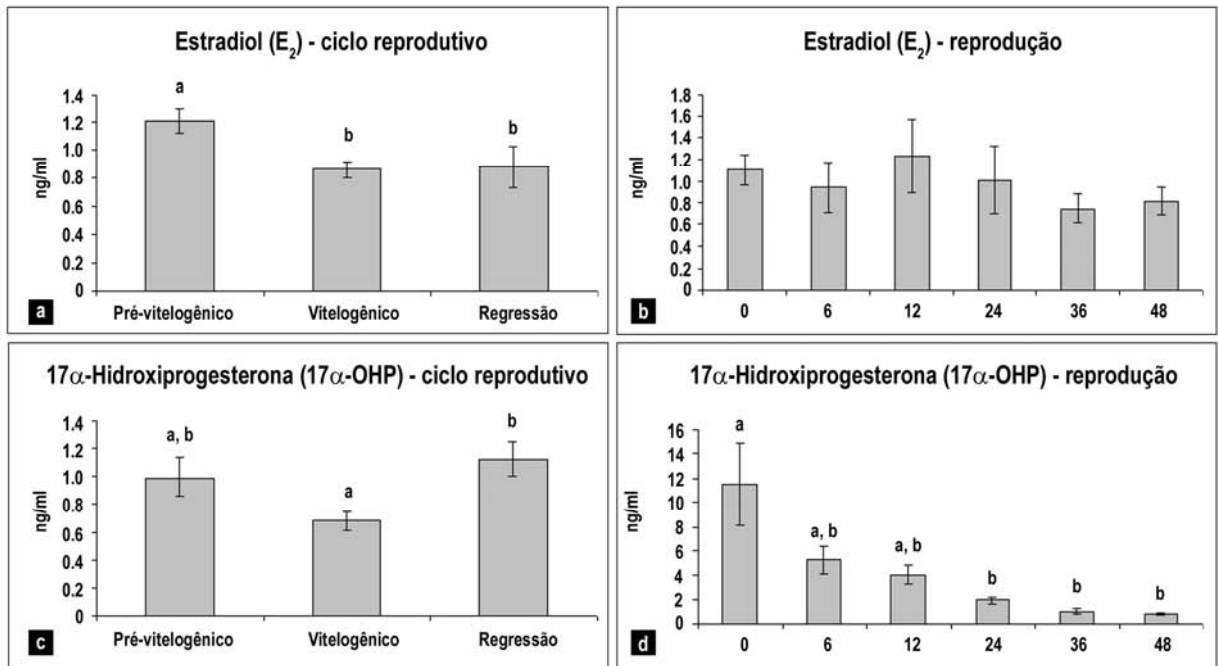
*Metanil Yellow* (a; b; f). Hematoxilina e eosina (c; d; e). Barra: 400 $\mu$ m (a), 30 $\mu$ m (b) e 300 $\mu$ m (c; d; e; f).



**Fig. 6.** *Steindachneridion parahybae*: Caracterização dos ovários após a indução hormonal artificial do surubim do Paraiba. a-d) Após 36 (a) e 48 (b; c; d) horas após a ESG foi possível observar a presença dos folículos pós-ovulatórios (cabeças de seta), no entanto, a presença de múltiplos oócitos vitelogênicos (setas) e poucos oócitos atrésicos (asterisco em “a”). Hematoxilina e eosina. Barra: 300 $\mu$ m.

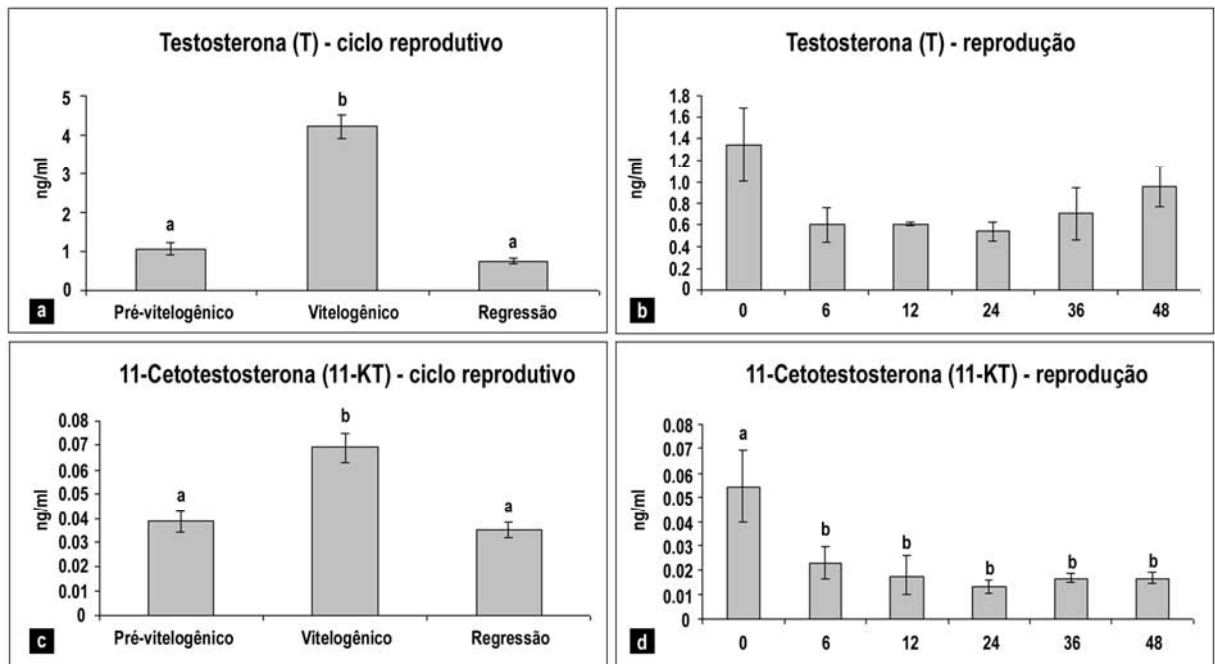






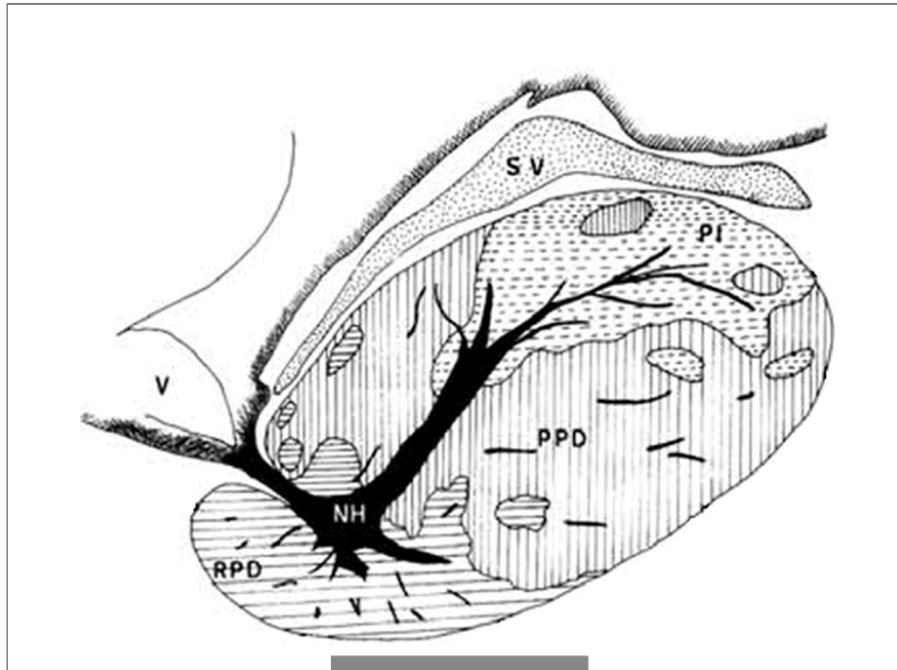
**Fig. 7.** *Steindachneridion parahybae*: Perfil plasmático dos esteróides sexuais no surubim do Paraíba durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução artificial. a, b) Perfil plasmático de  $E_2$  durante o ciclo reprodutivo (a) e após a indução à reprodução artificial em diferentes intervalos de tempo a partir do momento zero da ESG (b); c, d) Perfil plasmático de 17 $\alpha$ -OHP durante o ciclo reprodutivo (c) e após a indução à reprodução artificial em diferentes intervalos de tempo a partir do momento zero da ESG (d). Dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Diferentes letras indicam diferenças significativas durante o ciclo reprodutivo ou após a indução à reprodução artificial em diferentes intervalos de tempo a partir do momento zero da ESG.





**Fig. 8.** *Steindachneridion parahybae*: Perfil plasmático dos esteróides sexuais no surubim do Paraíba durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução artificial. a, b) Perfil plasmático de T durante o ciclo reprodutivo (a) e após a indução à reprodução artificial em diferentes intervalos de tempo a partir do momento zero da ESG (b); c, d) Perfil plasmático de 11-KT durante o ciclo reprodutivo (c) e após a indução à reprodução artificial em diferentes intervalos de tempo a partir do momento zero da ESG (d). Dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Diferentes letras indicam diferenças significativas durante o ciclo reprodutivo ou após a indução à reprodução artificial em diferentes intervalos de tempo a partir do momento zero da ESG.





# 3

## *CAPÍTULO*

---

Células hipofisárias de fêmeas de *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) durante a oogênese e a reprodução induzida em cativeiro.

Honji, R. M.; Caneppele, D.; Pandolfi, M. & Moreira, R. G.

**Células hipofisárias de fêmeas de *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) durante a oogênese e a reprodução induzida em cativeiro.**

Honji, R. M.<sup>1</sup>; Caneppele, D.<sup>2</sup>; Pandolfi, M.<sup>3</sup> & Moreira, R. G.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, Trav. 14, 321, 05508-090, São Paulo - SP, Brasil. \*e-mail: [renatagm@ib.usp.br](mailto:renatagm@ib.usp.br)

<sup>2</sup> – Companhia Energética de São Paulo (CESP), Unidade de Hidrobiologia e Aquicultura, Rodovia dos Tamoios, km 38. 12260-000, Brasil.

<sup>3</sup> – Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (C1428EHA), Buenos Aires, B.A., Argentina.

**Resumo**

*Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) é um bagre de água doce, considerada uma importante espécie de teleósteo da Bacia do Paraíba do Sul, e está criticamente ameaçada de extinção. Além disso, esta espécie endêmica desta Bacia enfrenta sérios problemas de reprodução quando sofrem condições de confinamento, o que dificulta a piscicultura de conservação de espécies ameaçadas de extinção. Para obter um melhor conhecimento das bases fisiológicas das disfunções reprodutivas apresentadas por teleósteos reofílicos impedidos de realizar a migração reprodutiva, nossos estudos focaram na caracterização, identificação e localização das diferentes células da hipófise de fêmeas de *S. parahybae* durante o ciclo reprodutivo anual e após a indução artificial à reprodução em cativeiro. Pelos métodos imuno-histoquímico e *Western blot*, nós caracterizamos as células produtoras de hormônio de crescimento (GH), prolactina (PRL), somatolactina (SL) e hormônio luteinizante (LH). No entanto, a caracterização do hormônio folículo estimulante (FSH) foi possível apenas com o método de *Western blot*. A distribuição e a localização das diferentes células hipofisárias foi similar ao já descrito para outras espécies de teleósteos. Entretanto, considerando-se a morfologia destas células durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução, algumas diferenças foram observadas. A análise semiquantitativa, avaliada pela densidade óptica indicou que o conteúdo dos hormônios da adeno-hipófise, GH, PRL e SL variaram durante o ciclo reprodutivo, com maiores valores no estágio vitelogênico

se comparado aos outros estádios de maturação (pré-vitelogênico e regressão), diferentemente do LH, que não variou durante o ciclo reprodutivo anual de *S. parahybae*. Após a indução à reprodução em cativeiro, apenas os hormônios LH, SL e GH, apresentaram um aumento na densidade óptica, sugerindo um controle de *feedback*, principalmente dos esteróides sexuais sobre o eixo hipotálamo-hipófise. Ambas gonadotropinas (FSH e LH) possuem um papel significativo na regulação da maturação ovariana em *S. parahybae*, e a disfunção reprodutiva desta espécie em cativeiro, ou seja, na maturação final e ovulação, provavelmente é devido a uma falha no estímulo da síntese e/ou liberação de LH. Além disso, as variações observadas nos hormônios da família do hormônio de crescimento (GH, PRL e SL) durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae*, sugerem que estes hormônios estão envolvidos indiretamente nos processos reprodutivos e pode ter um papel fisiológico na regulação e/ou na modulação de mecanismos associados à reprodução, ou seja, no *status* reprodutivo do surubim do Paraíba.

## 1. Introdução

Atualmente, mudanças no ambiente aquático devido a diversas ameaças, resultam em uma série de impactos sobre a fauna aquática, principalmente sobre a ictiofauna (Agostinho et al., 2003). Para os peixes reofílicos migratórios sulamericanos, tais ameaças incluem principalmente a poluição (doméstica e industrial) e as obstruções nos rios (construções de barragens), que afetam o fluxo de água de muitos rios brasileiros que muitas vezes são represados, sendo observada até mesmo, uma cadeia de reservatórios ao longo dos rios (Lucas & Baras, 2001; Silva et al., 2006).

Além desses impactos descritos acima, somado ao declínio das fontes naturais devido à pesca predatória e à crescente demanda para a diversificação dos produtos comercializáveis, há uma necessidade urgente da viabilização de novas espécies para a aquicultura comercial mundial (Lubzens et al., 2010). Uma nova visão para esta atividade surgiu progressivamente de numerosos estudos, também com importantes espécies ameaçadas de extinção, que vem sendo importantes na conservação de espécies ameaçadas, em uma área conhecida como piscicultura de conservação.

Por outro lado, muitas espécies de peixes ainda dependem da coleta de reprodutores selvagens no ambiente natural e na sua transferência para o cativeiro para a indução à reprodução artificial. Infelizmente, essa manutenção de reprodutores em cativeiro não é totalmente bem sucedida, porque muitas espécies de peixes apresentam disfunções reprodutivas quando criados em cativeiro (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010).

Essa disfunção reprodutiva em cativeiro é um problema comum enfrentado na aquicultura comercial e/ou piscicultura de conservação.

Um importante peixe migrador de água doce da ictiofauna brasileira é o bagre (*catfish*) *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae), comumente conhecido como surubim do Paraíba. É um peixe potamódromo (reofílico), ictiófago, endêmico da bacia do Paraíba do Sul (Garavello, 2005), seriamente ameaçado de extinção (Honji et al., 2009), e a sua biologia reprodutiva é pouco compreendida. Em cativeiro, *S. parahybae* apresenta disfunções reprodutivas, principalmente as fêmeas quando são submetidas ao sistema de cultivo. Estes animais apresentam ausência na maturação final dos oócitos e ovulação, e conseqüentemente não desovam espontaneamente em cativeiro. Estes fatos ressaltam a importância de aumentar o conhecimento sobre os processos neurais e hormonais que controlam a atividade reprodutiva desta espécie.

A hipófise é uma glândula endócrina “mestre”, que secreta um grupo de hormônios que controla vários processos fisiológicos em vertebrados, incluindo crescimento, osmorregulação, metabolismo, reprodução, entre outros processos (Kawauchi & Sower, 2006; Levavi-Sivan et al., 2010). Em peixes teleósteos, a hipófise consiste de dois componentes, uma região endócrina, denominada de adeno-hipófise (ADH) e outra região neuro-hemal, denominada de neuro-hipófise (NH) (Kawauchi & Sower, 2006). A ADH apresenta diferentes tipos celulares e tem sido proposto um padrão de distribuição dessas células nas três distintas regiões da ADH, *i.e.*, lactotrópicas e corticotrópicas na RPD (*rostral pars distalis*), tireotrópicas, somatotrópicas e gonadotrópicas na PPD (*proximal pars distalis*) e melanotrópicas e somatolactotrópicas na PI (*pars intermedia*). No entanto, algumas diferenças específicas têm sido observadas em teleósteos, principalmente em relação à distribuição ectópica de alguns tipos celulares (Kawauchi & Sower, 2006; Levavi-Sivan et al., 2010).

Adicionalmente, na aquicultura comercial e na piscicultura de conservação, a reprodução, o crescimento, o melhoramento da qualidade dos peixes entre outros fatores, podem ser aprimorados desenvolvendo estratégias de como alterar o controle de secreção dos hormônios da ADH, entretanto, semelhante manipulação dos hormônios da hipófise, requerem a identificação precisa, o entendimento e o mecanismo dos diferentes tipos celulares desta glândula (Levavi-Sivan et al., 2010; Mylonas et al., 2010; Zohar et al., 2010). Além do mais, sabe-se que os hormônios liberados pela ADH estão envolvidos diretamente no processo reprodutivo de teleósteos, e que vários estudos apontam que, principalmente as gonadotropinas (GtHs), são consideradas chaves no entendimento das possíveis causas fisiológicas na falha da reprodução em peixes teleósteos quando são mantidos em cativeiro



(Zohar & Mylonas, 2001; Amaral et al., 2007; Guzmán et al., 2009; Mylonas et al., 2010; Zohar et al., 2010). Além disso, outros hormônios da ADH podem ser responsáveis pela regulação de processos associados à reprodução e que podem também afetar indiretamente o *status* reprodutivo dos animais (como a família do hormônio de crescimento) (Vargas-Chacoff et al., 2009; Fiszbein et al., 2010; Onuma et al., 2010), nos quais, a prolactina (PRL), está envolvida nos processos de aclimatação e/ou aclimatização ambiental e na osmorregulação (Manzon, 2002; Mancera & McCornick, 2007), o hormônio de crescimento (GH), que regula o crescimento, o metabolismo intermediário e talvez esteja relacionado com os processos osmorregulatórios, e a somatolactina (SL), que apesar do específico papel fisiológico deste hormônio em teleósteos ainda não tenha sido definido, vários estudos apontam diferentes funções para a SL, *i.e.*, reprodução, coloração, metabolismo, entre outros (Kaneko, 1996; Cánepa et al., 2006).

Tendo estes pontos em consideração, o primeiro objetivo do presente estudo foi identificar e localizar os diferentes tipos celulares da hipófise de *S. parahybae*. O segundo objetivo do estudo foi analisar durante o ciclo reprodutivo anual e após a indução artificial à reprodução em cativeiro de fêmeas de *S. parahybae*, as GtHs, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), responsáveis pelo controle da gametogênese e esteroidogênese gonadal; e os três hormônios incluídos na família do hormônio de crescimento (GH, PRL e SL), que possuem múltiplas funções fisiológicas em teleósteos. Estes tópicos são essenciais para a compreensão dos processos fisiológicos desta espécie em cativeiro, avaliando o impacto deste ambiente sobre o sistema endócrino, além de fornecer subsídios para a melhor compreensão da fisiologia reprodutiva, auxiliando também na conservação desta espécie ameaçada de extinção.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Desenho experimental e coleta dos animais

O experimento foi conduzido na Piscicultura da Companhia Energética de São Paulo (CESP) (23° 24' 53,71'' S e 45° 35' 59,82'' W), localizada no município de Paraibuna (São Paulo, Brasil). Em dezembro de 2007, cem fêmeas adultas de *S. parahybae*, nascidas e criadas na CESP (primeira geração, F1; Caneppele et al., 2009), foram aleatoriamente distribuídas em dois viveiros (200m<sup>2</sup>) nesta piscicultura (50 fêmeas/viveiro). Durante o período experimental, os animais foram alimentados diariamente “*ad libitum*” com ração comercial extrusada para carnívoros, com teor de proteína bruta de 40% e granulometria de 6mm de diâmetro (Purina

TC 40). A concentração de oxigênio dissolvido na água foi monitorada diariamente com um oxímetro (Horiba – ModU10) que registrou também a temperatura da água.

No momento de cada coleta (mensalmente, exceto durante o inverno), quatro animais foram amostrados aleatoriamente em cada viveiro, e transportados para o laboratório da CESP. Os peixes no laboratório foram anestesiados por imersão em água contendo benzocaína anestésica (*ethyl-p-aminobenzoate*) previamente solubilizada em etanol, na proporção de 1g/20L de água, e os dados morfométricos e ponderais foram mensurados. Em seguida, os animais foram sacrificados por decapitação, e seus ovários rapidamente removidos e pesados, para posteriormente ser calculado o índice gonadossomático (IGS) (Vazzoler, 1996). Concomitantemente à coleta das gônadas, após a abertura da caixa craniana, a hipófise foi retirada juntamente com o encéfalo e fixada ou congelada dependendo de cada método descrito a seguir. Os procedimentos adotados para sacrificar os animais neste estudo estão de acordo com o Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolo: 072/2008).

Os seguintes estádios de maturação gonadal foram considerados no presente estudo, para as análises das possíveis variações das células hipofisárias durante o ciclo reprodutivo: pré-vitelogênico, vitelogênico e regressão. Estes estádios de maturação gonadal de *S. parahybae* foram confirmados através de ferramentas morfológicas e histológicas e estão descritos no Capítulo 2. Além destes estádios de maturação gonadal, durante o período reprodutivo de *S. parahybae* em cativeiro, os animais aptos à reprodução, foram induzidos artificialmente à reprodução na CESP, e um grupo adicional denominado “reprodução”, foi considerado. Neste grupo, as fêmeas foram induzidas com extrato hipofisário e após a extrusão a seco dos gametas (momento zero), os animais foram sacrificados e as hipófises também foram coletadas e fixadas ou congeladas. A metodologia da indução à reprodução artificial em cativeiro de *S. parahybae* está descrita no Capítulo 5.

## 2.2. Análise histológica da hipófise

Para esta análise, as hipófises das fêmeas, em cada estádio de maturação gonadal foram removidas e fixadas por 20-24 horas em solução de Bouin acético e desidratadas com uma série crescente de diluições de etanol. Em seguida, o material foi diafanizado em solução de xilol (*dimethylbenzene*), e infiltrado em Paraplast<sup>®</sup> (Erv-Plast, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda) de acordo com os procedimentos histológicos rotineiros (Behmer et al., 1976). Cortes seriados com 12µm foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina, hematoxilina ácida, ácido periódico de Schiff (PAS) e tricrômico de Masson. Os cortes

preparados foram analisados e documentados, utilizando-se um sistema computadorizado de captura de imagens (microscópio de luz transmitida – *Leica DM 1000*; câmera fotográfica – *Leica DFC 295*; e programa de captura de imagem – *Leica Application Suíte Professional, LAS V3.6*).

### 2.3. Análise de imuno-histoquímica da glândula hipofisária

Para a análise de imuno-histoquímica, os cortes seriados obtidos foram processados conforme as técnicas rotineiras de imuno-histoquímica com amplificação de sinal (metodologia descrita em Fiszbein et al., 2010).

#### 2.3.1. Anticorpos

Os anticorpos utilizados no presente estudo foram obtidos em coelhos (*rabbit*), contra o  $\beta$ -hormônio folículo estimulante (anti- $\beta$ -FSH) e  $\beta$ -hormônio luteinizante (anti- $\beta$ -LH) de *Fundulus heteroclitus* (Cyprinodontiformes), que foram doados gentilmente pelo Dr. A. Shimizu (*National Research Institute of Fisheries Sciences, Fisheries Research Agency, Kanazawa, Yokohama, Japan*), o hormônio de crescimento (anti-GH) e a prolactina (anti-PRL) de *Oncorhynchus keta* (Salmoniformes), que foram doados gentilmente pelo Dr. H. Kawauchi (*School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Iwate, Japan*) e a somatolactina (anti-SL) de *Sparus aurata*, que foi doado gentilmente pelo Dr. A. Astola (*Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Spain*).

#### 2.3.2. Recuperação antigênica

Com o objetivo de amplificar a imuno-reatividade (-ir) apenas para anti- $\beta$ -FSH e anti- $\beta$ -LH, os cortes foram tratados com tampão citrato (*buffer citrate*), após a desparafinização, reidratação e bloqueio da atividade da peroxidase endógena com 3% de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Para a recuperação, o material foi aquecido por 10 minutos a 90°C com tampão citrato, resfriado em temperatura ambiente e finalmente lavado em água destilada.

#### 2.3.3. Análise de imuno-histoquímica

Posteriormente à recuperação antigênica de anti- $\beta$ -FSH e de anti- $\beta$ -LH, os cortes foram lavados com tampão PBS (*fosfate buffer saline*, pH 7,4), por 5 minutos e em seguida foram submetidos ao bloqueio inespecífico com 5% de leite em pó desnatado, diluído em PBS por 30 minutos. Após este período, os cortes foram incubados durante toda a noite a 4°C com os anticorpos primários: anti- $\beta$ -FSH (1:1000), anti- $\beta$ -LH (1:1000), anti-GH, anti-PRL e anti-SL

(1:2000). Após o período de incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados em PBS por 5 minutos e incubados com o anticorpo secundário biotilado (*rabbit*, 1:600) por 45 minutos. Em seguida foram lavados novamente com PBS por 5 minutos e a amplificação de sinal foi realizada, incubando-se os cortes com estreptavidina, tiramida e peroxidase conjugada com estreptavidina (*Dako, CSA Amplification system kit – Code: k1500*) por 45 minutos cada um, de acordo com as especificações do fabricante. Após a incubação com estes reagentes, o material foi lavado novamente em PBS (5 minutos), e em seguida, a atividade da peroxidase foi visualizada com a solução cromogênica DAB (0,1% de 3,3 – diaminobenzidina (DAB) – *Dako Cytomation LSAB<sub>2</sub><sup>®</sup> System HRP Liquid DAB – Ref. 0673*). Posteriormente, o material revelado foi contra-corado com hematoxilina de *Carazzi* por 2–3 minutos. Por fim, as lâminas foram desidratadas, montadas e analisadas utilizando um sistema de análise computadorizado de imagens (descrito acima).

Para confirmar a especificidade das reações de imuno-histoquímica, os cortes controles foram incubados com o anticorpo primário pré-adsorvidos com excesso de seu respectivo antígeno, nos casos em que o antígeno estivesse disponível. Para evitar os falsos positivos, observado eventualmente nas reações de imuno-histoquímica, algumas lâminas tiveram o anticorpo primário omitido e substituído por PBS, e a omissão do anticorpo secundário também foi realizada. Adicionalmente, a especificidade dos anticorpos foi previamente demonstrada em outros estudos do nosso grupo de pesquisa em outras espécies de teleósteos (Pandolfi et al., 2001a, b, 2006, 2009a, b; Honji, 2007).

Todas as lâminas histológicas e de imuno-histoquímicas de *S. parahybae* foram depositadas na coleção científica do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP).

#### 2.4. Análise de Western blot

Adicionalmente, para caracterizar e para testar a especificidade dos diferentes anticorpos utilizados nas hipófises de *S. parahybae*, nós realizamos a análise com eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 15% de dodecil-sulfato de sódio (*SDS-PAGE*), seguindo posteriormente com o *Western blot*. Para esta análise, cinco hipófises foram coletadas, separadas manualmente dos encéfalos e congeladas em gelo seco, e posteriormente transferidas para freezer -80°C até o momento do processamento.

As hipófises congeladas foram homogeneizadas com 400 µl de tampão TRIS-HCl (50 mM), pH 7,4 e adicionado 3 µl de uma mistura de inibidor de proteases (*Sigma, St Louis, MO*), posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 g a 5 minutos a 4°C,

ao sobrenadante também foi adicionado a mesma mistura de inibidor de proteases (3 µl). Em seguida, 18µl deste homogeneizado foram adicionados 6 µl de tampão (120 mM TRIS-HCl; pH 6,8; 3% dodecil-sulfato; 10% glicerol; 1% β-mercaptoetanol), em seguida, todos os homogeneizados foram aquecidos até 95°C por 10 minutos, sendo posteriormente, resfriado em temperatura ambiente. Depois da eletroforese deste homogeneizado (15% SDS-PAGE), as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Whatman*<sup>®</sup> *Schleicher & Schuell*), por 1 hora a 4°C à 75 V. Para verificar a total transferência das proteínas para a membrana, foi utilizada a coloração reversível de *Ponceau S*, sendo posteriormente escaneada, além de ser utilizada (*Ponceau*) como fonte alternativa no controle de carga em *Western blot* (Dittmer & Dittmer, 2006; Aldridge et al., 2008; Romero-Calvo et al., 2010). Adicionalmente, para o marcador molecular (*ColorBrust*<sup>™</sup> *Eletrophoresis Marker*, Sigma), foi utilizado 5 µl, para posteriormente, com base neste marcador, serem calculados os pesos moleculares.

Posteriormente, as membranas foram lavadas com TTBS (100 mM TRIS-HCl; 0,9% NaCl; 0,1% Tween-20), pH 7,5, e em seguida, bloqueado com TTBS contendo 5% de leite em pó desnatado e 3% de BSA (albumina de soro bovino), a 4°C durante toda a noite. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários: anti-β-FSH (1:1000), anti-β-LH e anti-GH (1:3000) e anti-PRL e anti-SL (1:2000), por 3 horas em temperatura ambiente. Após este período, três lavagens com TTBS foram realizadas, e as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (*rabbit*: 1:300), por uma hora, e logo em seguida, lavado novamente com TTBS. Finalmente, as membranas com anti-GH, anti-PRL, anti-SL e anti-β-LH foram incubadas (no escuro) com peroxidase conjugada com estreptavidina (*Streptavidin HRP*, DAKO) por 45 minutos e posteriormente, lavadas com TTBS. Para a visualização da atividade da peroxidase na membrana de nitrocelulose, as amostras foram visualizadas com a solução cromogênica DAB (*Dako Cytomation*). As membranas com anti-β-FSH, foram incubadas (no escuro) com fosfatase alcalina conjugada com estreptavidina (*alkaline phosphatase*, DAKO) por 45 minutos e visualizadas com o kit *alkaline phosphatase conjugate* (*Bio-Rad, Hercules, California*).

Por fim, todas as membranas foram escaneadas, e os seus pesos moleculares foram estimados utilizando-se o programa *Image Gauge software* (*Fuji, Japan*). Adicionalmente, como descrito para as reações de imuno-histoquímica, os controles (positivo e negativo), também foram realizados para as análises de *Western blot*.

### 2.5. Análises de dados

Para as análises morfométricas das células hipofisárias durante o ciclo reprodutivo anual e após a indução à reprodução em cativeiro, os seguintes parâmetros foram utilizados: densidade óptica das células-ir e área celular e nuclear (Fig. 1a).

#### 2.5.1. Análise semiquantitativa da densidade óptica

Para a análise da densidade óptica da imuno-marcação, as imagens de cada amostra, capturada pelo sistema LAS (tamanho da imagem: 1260 pixels por 960 pixels), foram analisadas com o auxílio do programa *Image Gauger*, versão 3.12 (análises similares foram descritas em Cánepa et al., 2008; Fiszbein et al., 2010).

Quinze células-ir de cada imagem (dez imagens de cada animal por estágio de maturação gonadal e no grupo reprodução), que apresentavam os núcleos nítidos foram selecionadas aleatoriamente para a medição da densidade óptica (a.u.). Adicionalmente, para reduzir a variabilidade nos resultados de imuno-histoquímica, as condições destas reações foram controladas e mantidas homogêneas em todos os parâmetros. Além disso, devido ao fato de ser difícil comparar a intensidade de imuno-marcação entre as amostras processadas separadamente, representantes de cada estágio de maturação gonadal e após a indução à reprodução em cativeiro foram incluídas em cada lote de reação de imuno-histoquímica para controlar estas possíveis diferenças de imuno-marcação.

#### 2.5.2. Análise semiquantitativa do diâmetro celular e nuclear

As mesmas imagens utilizadas nas análises da densidade óptica foram utilizadas para as medições do diâmetro celular e nuclear (em  $\mu\text{m}^2$ ) dos diferentes tipos de células-ir na hipófise durante o ciclo reprodutivo. Para estas análises, quinze células-ir de cada animal (que apresentavam os núcleos claramente visíveis) foram aleatoriamente selecionadas e analisadas utilizando-se o programa *Image-Pro<sup>®</sup> Plus – The Proven Solution* (versão, 4.5.0.29). Estas análises foram previamente descritas por Pandolfi et al. (2001a, 2005); Cánepa et al. (2006, 2008); Honji (2007) e Fiszbein et al. (2010).

### 2.6. Análises estatísticas

Para as análises de resultados, os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média ( $M \pm \text{EPM}$ ). Valores médios de cada parâmetro foram comparados levando em consideração o estágio de maturação gonadal (pré-vitelogênico, vitelogênico e regressão) e após a indução à reprodução (grupo reprodução). As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando-se

a análise de variância (one-way ANOVA), seguido pelo teste *Student-Newman-Keuls* (SNK) para análises paramétricas ou o teste *Dunn's* ou *Tukey* para as análises não-paramétricas. Em todas as análises, diferenças significativas foram consideradas quando  $P < 0,05$  (Zar, 2010). Adicionalmente, estas análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico *SigmaStat* para *Windows* (versão, 3.10, *Copyright*).

### 3. Resultados

No presente estudo, todos os animais utilizados eram fêmeas adultas e apresentaram alterações macroscópicas no desenvolvimento ovariano durante o ciclo reprodutivo anual. O valor de IGS aumentou do estágio pré-vitelogênico para o vitelogênico e permaneceu elevado nas fêmeas aptas à reprodução ( $P < 0,01$ ), diminuindo no estágio regressão ( $P < 0,01$ ), com valores próximos ao estágio pré-vitelogênico (Tabela 1). Foram amostrados 28 animais no estágio pré-vitelogênico, 22 animais no estágio vitelogênico, 18 animais no estágio regressão e 6 animais foram induzidos a reprodução (Tabela 1). Dentre estes animais, a média do comprimento padrão e massa corpórea total variaram respectivamente de:  $35,93 \pm 0,64$  cm e  $698,52 \pm 29,50$  g no estágio pré-vitelogênico,  $34,50 \pm 0,55$  cm e  $596,66 \pm 25,35$  g no estágio vitelogênico,  $33,61 \pm 0,46$  cm e  $603,85 \pm 29,97$  g no estágio regressão e  $33,07 \pm 0,09$  cm e  $541,67 \pm 8,08$  g no grupo reprodução. Adicionalmente, estes dados não apresentaram diferenças significativas durante o ciclo reprodutivo (Tabela 1).

#### 3.1. Análises histológicas, imuno-histoquímicas e *Western blot*

A hipófise de *S. parahybae* localiza-se na região ventral do hipotálamo médio basal, conectado por um fino pedúnculo hipofisário (Fig. 1b). Esta glândula consiste de dois componentes, a NH e ADH (Fig. 1c), sendo que, este último componente é subdividido em *rostral pars distalis* (RPD), que é a região anterior da glândula, *proximal pars distalis* (PPD), que é a região central, e *pars intermedia* (PI), que é a região posterior (Fig. 1d).

Como nas análises histológicas os resultados evidenciaram que a hipófise de *S. parahybae* apresentou as mesmas regiões já descritas para outros teleósteos, os resultados aqui apresentados e discutidos, foram focados nas análises de imuno-histoquímica durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução, e que será discutido posteriormente.

A região anterior, RPD, apresentou finos ramos de NH e dois tipos celulares foram identificados nesta região. As células que sintetizam a PRL e outras que produzem o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). As células produtoras de PRL não foram facilmente identificadas com os métodos histológicos (*i.e.*, tricrômico de Masson) e são PAS-negativas.

Entretanto, estas células foram facilmente imuno-reativas com o anticorpo de *O. keta* (Figs. 2a, b), que não apresentou nenhuma reação cruzada com outra célula da ADH. Adicionalmente, não foram identificadas células-ir com anti-PRL fora da região da RPD, e as mesmas, são células fracamente acidófilas, organizadas em um arranjo cordonal e de tamanho reduzido ( $13,62 \pm 0,17 \mu\text{m}^2$ ). As células que sintetizam o ACTH também foram observadas nesta região, são células fracamente basófilas e PAS-negativo e não foram identificadas por imuno-histoquímica.

Na região central, PPD, a NH apresentou vários ramos extremamente ramificados, e apesar de se observar a presença de várias células na PPD, pelo método histoquímico, apenas 2 tipos celulares-ir foram identificados, as células produtoras de  $\beta$ -LH e GH. Várias células-ir com anti-GH ( $11,27 \pm 0,16 \mu\text{m}^2$ ) foram identificadas em toda região da PPD com o anticorpo de *O. keta* (Figs. 2c, d), que também não apresentou reações cruzadas com qualquer outra tipo celular da ADH e as mesmas, são restritas à região central. Estas células são PAS-negativas, acidófilas e apresentaram uma forma oval, próximos aos ramos da NH e aos vasos sanguíneos, e também contêm um núcleo grande, excêntrico e de contorno irregular (Fig. 2d). As células GtHs são as mais abundantes na região da PPD e facilmente reconhecidas pelos métodos histoquímicos. São células globosas, basófilas, PAS-positivas e contêm vacúolos em seu interior. Apesar de serem as células mais abundantes da PPD, apenas um tipo de GtH foi imuno-reativo com o anticorpo de *F. heteroclitus* ( $\beta$ -LH,  $12,23 \pm 0,11 \mu\text{m}^2$ ) (Figs. 3a, b). Adicionalmente, com o anti- $\beta$ -FSH, não foi identificado qualquer célula-ir com o anticorpo de *F. heteroclitus* o que será posteriormente discutido. As células produtoras do hormônio estimulante da tireóide (TSH) também foram observadas nesta região com o método histoquímico. São células basófilas e PAS-positiva, no entanto, assim com para ACTH, estas células não foram identificadas por imuno-histoquímica.

A região posterior, PI, foi caracterizada por ser uma região ampla, com numerosos ramos de NH e com a presença de várias células PAS-positivas. Estas células são responsáveis pela síntese e liberação de SL, que também foram imuno-reativas com o anticorpo de *S. aurata* (Figs. 3c, d), e nenhuma célula-ir com anti-SL foi identificada fora da PI. Estas células são pequenas ( $11,37 \pm 0,17 \mu\text{m}^2$ ), ligeiramente acidófilas e, apesar da SL pertencer à família do hormônio de crescimento, nenhuma reação cruzada entre o anticorpo SL com PRL e GH foi observada, assim como, nenhuma reação positiva foi observado nestas células quando incubadas com os anticorpos de salmão (GH e PRL). Na PI, o hormônio estimulante de melanóforos (MSH) é produzido por células fracamente acidófilas, PAS-negativo e foram caracterizadas apenas com o método histoquímico.



Por fim, a figura 4 sumariza os resultados obtidos pelo *Western blot* para testar a especificidade dos anticorpos de *F. heteroclitus*, *O. keta* e *S. aurata* na hipófise de *S. parahybae*. Esta especificidade pode ser inferida na ausência de imuno-reatividade quando os anticorpos primários são incubados com o excesso de antígenos ou omissão do anticorpo primário, método este, que também pode ser inferido nas análises de imuno-histoquímica (dados não apresentados). O resultado desta análise reconheceu uma banda específica na hipófise de *S. parahybae* com os anticorpos de *F. heteroclitus*, *O. keta* e *S. aurata*, e os seguintes pesos moleculares estimados foram: para o  $\beta$ -FSH (18KDa), para o  $\beta$ -LH (19KDa), para o GH (21KDa), para a SL (26KDa) e para a PRL (22KDa).

### 3.2. Análise semiquantitativa de densidade óptica e diâmetro celular e nuclear

Em relação à densidade óptica durante o ciclo reprodutivo e após a reprodução artificial de *S. parahybae* em cativeiro, algumas diferenças significativas foram identificadas. Para o  $\beta$ -LH, os valores de densidade óptica apresentaram-se constantes do estágio pré-vitelogênico ( $113,19 \pm 6,50$  a.u.) para o vitelogênico ( $120,53 \pm 1,10$  a.u.) e regressão ( $120,68 \pm 1,34$  a.u.) (Fig. 5a). Entretanto, os animais induzidos à reprodução ( $130,97 \pm 1,66$  a.u.) apresentaram um aumento da densidade óptica para o  $\beta$ -LH se comparados com os animais em todos os outros estádios ( $P < 0,05$ ) (Fig. 5a). Para o GH, durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae*, os valores de densidade óptica aumentaram significativamente do estágio pré-vitelogênico ( $128,94 \pm 1,43$  a.u.) para o vitelogênico ( $147,48 \pm 0,82$  a.u.) ( $P < 0,01$ ), diminuindo no estágio regressão ( $141,07 \pm 1,48$  a.u.) ( $P < 0,01$ ) (Fig. 5b). Após a indução à reprodução em cativeiro, o valor de densidade óptica para o GH ( $162,21 \pm 2,40$  a.u.) foi maior se comparado aos outros estádios de maturação gonadal ( $P < 0,01$ ) (Fig. 5b).

Para a PRL, os valores de densidade óptica durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae*, apresentaram o mesmo padrão de distribuição ao descrito para o GH, ou seja, estes valores aumentaram significativamente do estágio pré-vitelogênico ( $134,70 \pm 1,61$  a.u.) para o vitelogênico ( $162,17 \pm 1,95$  a.u.) ( $P < 0,01$ ), diminuindo no estágio regressão ( $152,99 \pm 1,51$  a.u.) ( $P < 0,01$ ) (Fig. 5c). No entanto, após a indução à reprodução, o valor de densidade óptica no grupo reprodução ( $157,05 \pm 1,77$  a.u.), foi diferente apenas do estágio pré-vitelogênico ( $P < 0,01$ ) (Fig. 5c). Para a SL, esta análise semiquantitativa, apresentou um aumento da densidade óptica do estágio pré-vitelogênico ( $114,15 \pm 1,46$  a.u.) para o vitelogênico ( $160,67 \pm 1,56$  a.u.) ( $P < 0,01$ ), diminuindo no estágio regressão ( $152,85 \pm 1,46$  a.u.) ( $P < 0,01$ ), e após a indução à reprodução ( $196,35 \pm 0,92$  a.u.), um novo aumento neste grupo foi observado ( $P < 0,01$ ) (Fig. 5d), resultados semelhantes ao GH.

Os diâmetros celular e nuclear das células-ir com anti-LH não apresentaram diferenças estatísticas durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae* (respectivamente, pré-vitelogênico:  $11,85 \pm 0,17 \mu\text{m}^2$  e  $6,75 \pm 0,09 \mu\text{m}^2$ ; vitelogênico:  $12,26 \pm 0,21 \mu\text{m}^2$  e  $7,03 \pm 0,10 \mu\text{m}^2$ ; regressão:  $12,54 \pm 0,21 \mu\text{m}^2$  e  $6,99 \pm 0,12 \mu\text{m}^2$ ; reprodução:  $12,73 \pm 0,30 \mu\text{m}^2$  e  $6,71 \pm 0,13 \mu\text{m}^2$ ) (Fig. 6a). Por outro lado, o diâmetro celular das células-ir com anti-GH apresentaram diferenças significativas durante o ciclo reprodutivo, com maior valor observado no estágio regressão ( $12,51 \pm 0,35 \mu\text{m}^2$ ) se comparados com os valores dos estádios pré-vitelogênico ( $10,94 \pm 0,32 \mu\text{m}^2$ ) e vitelogênico ( $11,19 \pm 0,26 \mu\text{m}^2$ ) ( $P < 0,05$ ), e manteve-se com os valores próximos ao grupo “reprodução” ( $11,27 \pm 0,33 \mu\text{m}^2$ ) (Fig. 6b). Adicionalmente, o diâmetro nuclear das células-ir com anti-GH não apresentaram diferenças significativas durante o ciclo reprodutivo.

No que tange às células-ir com anti-PRL, também apresentaram diferenças significativas durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae*, ou seja, o diâmetro celular no estágio vitelogênico ( $15,13 \pm 0,21 \mu\text{m}^2$ ) foi significativamente maior que nos estádios pré-vitelogênico ( $12,98 \pm 0,23 \mu\text{m}^2$ ), regressão ( $12,89 \pm 0,53 \mu\text{m}^2$ ) e reprodução ( $13,30 \pm 0,47 \mu\text{m}^2$ ) ( $P < 0,01$ ) (Fig. 6c). Adicionalmente, o diâmetro nuclear das células-ir com anti-PRL não apresentaram diferenças significativas durante o ciclo reprodutivo. Em relação ao diâmetro celular das células-ir com anti-SL, também apresentaram diferenças, nas quais, os valores nos estádios vitelogênico ( $12,16 \pm 0,30 \mu\text{m}^2$ ) e regressão ( $12,56 \pm 0,37 \mu\text{m}^2$ ), foram estatisticamente maiores dos estádios pré-vitelogênico ( $10,66 \pm 0,24 \mu\text{m}^2$ ) e reprodução ( $10,91 \pm 0,20 \mu\text{m}^2$ ) ( $P < 0,01$ ) (Fig. 6d). Adicionalmente, o diâmetro nuclear das células-ir com anti-SL não apresentaram diferenças significativas durante o ciclo reprodutivo.

#### 4. Discussão

A análise dos valores de IGS durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae* sugere que, mesmo em cativeiro, os animais apresentam um completo desenvolvimento ovariano, pois, estes valores aumentam do estágio pré-vitelogênico para o vitelogênico. No entanto, apesar do completo desenvolvimento ovariano em cativeiro, fêmeas de *S. parahybae* apresentam uma disfunção no sistema endócrino neste ambiente, pois não conseguem ovular espontaneamente em cativeiro e conseqüentemente não se reproduzem nestas condições, demonstrando assim, a importância de estudos básicos sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas destas fêmeas neste ambiente.

Neste estudo, nós apresentamos as duas regiões da hipófise (NH e ADH), a identificação e a localização das diferentes células da região da ADH e suas variações

morfológicas durante o ciclo reprodutivo anual de *S. parahybae* em cativeiro. Embora a distribuição e localização destas células nesta região (ADH) em *S. parahybae* sejam similares ao já descrito para outras espécies de teleósteos (revisões: Kawauchi & Sower, 2006; Agulleiro et al., 2006; Takei & Loretz, 2006; Yaron & Sivan, 2006; Levavi-Sivan et al., 2010; Zohar et al., 2010), esta morfologia detalhada das diferentes células da ADH em espécies reofílicas sulamericanas quando mantidas em cativeiro, e que apresentam disfunções endócrinas neste ambiente, ainda não foram realizadas. Assim, um dos primeiros passos nestas investigações em peixes reofílicos, quando sofrem condições de confinamento, é a identificação precisa das diferentes células da ADH, demonstrando assim, a importância do presente estudo.

As células GtHs são as mais abundantes na região da PPD e apresentam um papel crucial na regulação dos processos reprodutivos de qualquer espécie, ou seja, a síntese e a liberação de GtHs são necessárias e são pontos críticos para o sucesso na maturação gonadal e desova (Zohar & Mylonas, 2001; Zohar et al., 2010; Mylonas et al., 2010; Levavi-Sivan et al., 2010). Em relação às gonadotropinas ( $\beta$ -FSH e  $\beta$ -LH), ambas foram identificadas na ADH de *S. parahybae* com os anticorpos contra GtHs de *F. heteroclitus*. Entretanto, apenas para o  $\beta$ -LH foi identificado nas reações de imuno-histoquímica e *SDS-PAGE* seguido pelo *Western blot*. Já para o  $\beta$ -FSH, apenas a reação de *Western blot* apresentou sucesso. Essa diferença observada na identificação de  $\beta$ -FSH e  $\beta$ -LH em *S. parahybae* (por diferentes métodos) ocorre provavelmente devido a estrutura molecular, filogenia e evolução das GtHs, que é comentada abaixo.

Particularmente, a identificação precisa das células produtoras de  $\beta$ -FSH utilizando anticorpos heterólogos é muito difícil de se realizar, devido às reações cruzadas e/ou baixa especificidade entre as diferentes formas moléculas de  $\beta$ -FSH de diferentes espécies (Vissio et al., 1996; Shimizu et al., 2003a, b; Pandolfi et al., 2006, 2009a, b). Os anticorpos contra  $\beta$ -FSH e  $\beta$ -LH de *F. heteroclitus* foram utilizados com sucesso no reconhecimento destas células em diversas espécies de teleósteos (Shimizu et al., 2003a), pois reconhecem as regiões conservadas de FSH e LH de teleósteos. Por outro lado, Shimizu et al. (2003a), também não apresentaram bons resultados na identificação de  $\beta$ -FSH no bagre *Ictalurus punctatus* (*catfish*), quando utilizaram o anticorpo de *F. heteroclitus* e, provavelmente, esta falta de imuno-marcação foi devido a baixa similaridade da região de reconhecimento, ou seja, a sequência de aminoácido desta região apresenta de 36-55% de similaridade entre *F. heteroclitus* e Ostariophysi (grupo que englobam a ordem Siluriformes). Além disso, a especificidade dos anticorpos,  $\beta$ -FSH e  $\beta$ -LH (de *F. heteroclitus*) nas GtHs de *S. parahybae*

não apresentaram dúvidas, pois como observado nas análises de imuno-histoquímica (para  $\beta$ -LH) e *Western blot* (para  $\beta$ -LH e  $\beta$ -FSH), a diminuição da marcação quando incubado com os diferentes anticorpos com os seus respectivos antígenos de *F. heteroclitus* (teste de pré-adsorção), confirmam a especificidade destas reações.

As GtHs são glicoproteínas, heterodímeros, formadas por duas subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$ ), sendo que, a subunidade “ $\alpha$ ” é comum entre as GtHs e a mais conservada entre as espécies de peixes (composição de aminoácidos), e a subunidade  $\beta$  é a unidade que determina a atividade e especificidade do hormônio (Levavi-Sivan et al., 2010). Neste sentido, a subunidade “ $\alpha$ ” de peixe que é semelhante à de mamíferos, possui dois potenciais sítios para N-glicosilação e dez cisteínas conservadas, que formam cinco pontes dissulfeto intra-moleculares. Por outro lado, a subunidade  $\beta$ , contém doze cisteínas conservadas, ligadas por seis pontes dissulfetos em tetrápodes, estrutura que é conservada em peixes apenas para  $\beta$ -LH, diferentemente, de  $\beta$ -FSH, que é a menos conservada em estrutura e sequência primária (Levavi-Sivan et al., 2010). Este número de cisteínas e de pontes dissulfetos presentes na molécula de GtHs, implicam na estrutura terciária da molécula, o que pode dificultar a identificação do sítio ativo desta molécula e conseqüentemente a localização do anticorpo nas GtHs, principalmente, em relação ao  $\beta$ -FSH que é a menos conservada em peixes, ou seja, é observada diferença na estrutura terciária da molécula, principalmente de  $\beta$ -FSH (Levavi-Sivan et al., 2010). Provavelmente, por conta desta diferença de estrutura e sequência do  $\beta$ -FSH, a reação de imuno-histoquímica em *S. parahybae* não foi positiva, sendo identificada apenas pela análise de *SDS-PAGE*. Essa identificação do  $\beta$ -FSH pelo *SDS-PAGE* é devido ao método de análise, pois no homogenizado de hipófise ao adicionar o tampão (120 mM TRIS-HCl; pH 6,8; 3% dodecil-sulfato; 10% glicerol; 1%  $\beta$ -mercaptoetanol) e posteriormente aquecido, a estrutura da proteína é quebrada, tornando-se linear e provavelmente expondo o (s) sítio (s) ativo (s) e conseqüentemente o reconhecimento do anticorpo de  $\beta$ -FSH de *F. heteroclitus* nas GtHs de *S. parahybae*. Adicionalmente, os pesos moleculares das GtHs identificados para *S. parahybae* estão próximos ao observado para outra espécie de bagre, o *I. punctatus*, no qual, o peso molecular estimado foi de 20KDa para  $\beta$ -FSH e 21KDa para  $\beta$ -LH (Zmora et al., 2003, 2007). Além disso, variações nos pesos moleculares para GtHs são observadas em várias espécies de teleosteos (revisão: Levavi-Sivan et al., 2010).

Adicionalmente, devido a estrutura terciária destes hormônios, a separação das subunidades “ $\alpha$ ” da “ $\beta$ ” é difícil, o que dificulta a elaboração de protocolos para a determinação dos níveis plasmáticos circulantes das GtHs (Swanson et al., 2003; Shimizu et al., 2003a, b; Levavi-Sivan et al., 2010; Zohar et al., 2010). Atualmente, só é possível a

determinação plasmáticas de  $\beta$ -FSH e  $\beta$ -LH para algumas espécies de salmonídeos (Levavi-Sivan et al., 2010), principalmente para *O. mykiss* (Govoroun et al., 1998) e para *Oreochromis niloticus* (Aizen et al., 2007). Neste contexto, outros métodos foram desenvolvidos para analisar a variação do perfil de  $\beta$ -FSH e  $\beta$ -LH durante o ciclo reprodutivo dos peixes teleósteos, como por exemplo, expressão gênica das GtHs, imuno-histoquímica, *Western blot* entre outros (Levavi-Sivan et al., 2010; Zohar et al., 2010), sendo estes dois últimos seguidos de uma análise de imagens, e que demonstraram boas interpretações fisiológicas dos resultados através deste método (Honji, 2007; Fiszbein et al., 2010), e que será discutido a seguir.

Sabe-se que três disfunções reprodutivas em peixes são observadas em várias espécies quando são criadas em cativeiro: 1) completa ausência do desenvolvimento dos gametas, ou seja, a espermatogênese e vitelogênese falham completamente quando os animais são mantidos em cativeiro e este processo pode ser observado em enguias, *Anguilla anguilla* (Zohar & Mylonas, 2001; van Ginneken & Maes, 2005); 2) apenas ausência na liberação dos oócitos, ou seja, ocorre a ovulação mas não a liberação dos oócitos, como identificado em cultivo de salmonídeos (Bromage et al., 1992); 3) baixa qualidade e/ou quantidade de espermatozoides durante a espermiacção e/ou falha na maturação final e ovulação, quando os oócitos apresentam a vitelogênese completa (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010). Desta forma, devido a falta de imuno-marcação das células de  $\beta$ -FSH em hipófises de *S. parahybae*, não foi possível analisar durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução em cativeiro, esta GtH. No entanto, ao analisar histologicamente o desenvolvimento ovariano (Capítulo 2), foi possível identificar que as fêmeas de *S. parahybae* em cativeiro apresentam vários oócitos vitelogênicos, sugerindo que a síntese e liberação de  $\beta$ -FSH não foram alteradas quando as fêmeas são submetidas às condições de cativeiro e, portanto, a deficiência na reprodução em cativeiro de *S. parahybae* não estaria relacionado com a falha na vitelogênese, processo regulado pelo  $\beta$ -FSH (como observado em enguias, *A. anguilla*) e sim, durante a maturação final e ovulação, ou seja, o terceiro tipo de disfunção relatada pelos autores acima citados.

Neste caso a disfunção observada é a falha na maturação final e ovulação, processos estritamente modulados pela síntese e liberação do  $\beta$ -LH, e com as análises semiquantitativas, algumas considerações podem ser sugeridas. Apesar de uma tendência no aumento da densidade óptica do estágio pré-vitelogênico para o vitelogênico, este não foi significativo, ou seja, não foi suficiente para estimular a maturação final e ovulação dos oócitos de *S. parahybae*, e que, o aumento deste parâmetro no grupo “reprodução” diferentemente dos

outros estádios de maturação, indicam que a falha neste processo fisiológico é provavelmente, devido à falta de algum estímulo na síntese e/ou liberação desta GtH, que por sua vez, estimularia a síntese dos progestágenos efetivos em peixes, que são responsáveis pela maturação final e ovulação (Levavi-Sivan et al., 2010; Taranger et al., 2010; Zohar et al., 2010). Adicionalmente, é importante salientar que no presente estudo, a indução hormonal à reprodução de *S. parahybae*, e conseqüentemente a maturação final e ovulação dos oócitos desta espécie, foram realizadas com duas doses de extrato hipofisário de carpa, ou seja, estimulação externa com GtHs de outra espécie de teleósteo, e que o aumento observado no grupo “reprodução” para o  $\beta$ -LH, pode ter sido efeito de um *feedback* causado pelos esteróides gonadais sobre a própria hipófise de *S. parahybae* e/ou nos neurônios de *kisspeptina*, que por sua vez, estimularia o GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas) no hipotálamo, e este último, modularia a síntese e liberação de  $\beta$ -LH de *S. parahybae* (Levavi-Sivan et al., 2010; Taranger et al., 2010; Zohar et al., 2010). Neste caso, sugere-se uma análise também no sistema *kisspeptina*-GnRH de *S. parahybae* e no perfil plasmático dos esteróides gonadais, principalmente no  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, que é o hormônio indutor da maturação final e ovulação na maioria das espécies de teleósteos (Zohar et al., 2010).

Além disso, alguns estudos indicam que a disfunção no sistema endócrino quando as fêmeas sofrem condições de confinamento, não apresentam necessariamente a mesma base fisiológica (Mylonas et al., 2010). Esta consideração deve-se ao fato, de que em muitas espécies de teleósteos, a disfunção na maturação final e ovulação são atribuídas pela falta de liberação de  $\beta$ -LH nas células da ADH (Mylonas et al., 2010), enquanto para outras espécies de teleósteos, principalmente para as espécies consideradas potamódromas (como *S. parahybae*), o problema sugerido é observado em um passo anterior, ou seja, na síntese de  $\beta$ -LH (Amaral et al., 2007). Estudos adicionais neste contexto ainda precisam ser realizados para *S. parahybae*.

Ainda neste contexto, recentemente um novo hormônio reprodutivo sintetizado na hipófise foi descoberto, o chamado, peptídeo relacionado ao polipeptídeo que ativa a adenilato ciclase (*adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-related peptide (PRP)*) (Tam et al., 2007, 2011). Inicialmente PRP foi previamente denominado como um peptídeo parecido com o hormônio liberador do hormônio de crescimento (*GHRH-like*) (Lee et al., 2007), ou seja, relacionado com a liberação de GH. No entanto, segundo Tam et al. (2011), em *Carassius auratus* o PRP (gfPRP) controla a expressão de hormônios reprodutivos no encéfalo, hipófise e gônadas, ou seja, gfPRP exerce um efeito estimulatório no GnRH, FSH e

LH (hipofisários) e uma inibição do LH sintetizado pelas gônadas (para maiores detalhes de produção de GtHs extra-hipofisários: Levavi-Sivan et al., 2010). Em relação ao GH, o gfPRP, não exerce nenhum efeito neste hormônio (Tam et al., 2007, 2011). Neste caso, os autores supracitados, sugerem uma nova função de PRP e PACAP na fisiologia reprodutiva em peixes, *i.e.*, uma nova direção de pesquisa nos estudos do controle neuroendócrino da reprodução em teleósteos. Adicionalmente, em nosso grupo de pesquisa foi identificada a presença de FSH e LH nos ovários de *S. parahybae* (dados não publicados) e novas direções de estudos nesta espécie estão sendo realizados.

A família dos hormônios somatotrópicos (GH, PRL e SL), que são similares em sua estrutura e organização gênica (Kawauchi & Sower, 2006), apresenta múltiplas funções fisiológicas em teleósteos. Apesar de diversos estudos em relação a esta família de hormônios terem sido realizados, a grande maioria dessas investigações tem focado sobre a identificação, distribuição e caracterização desses hormônios na hipófise de teleósteos (García-Herández et al., 1996; Vissio et al., 1996, 1997; García-Ayala et al., 1997; Segura-Noguera et al., 2000; Pandolfi et al., 2001a; Sánchez-Cala et al., 2003; Grandi & Chicca, 2004; Kawauchi & Sower, 2006; Agulleiro et al., 2006; Takei & Loretz, 2006; Yaron & Sivan, 2006; Borella et al., 2009; entre outros estudos). No entanto, são poucos os estudos conduzidos analisando as possíveis variações sazonais dessas moléculas e/ou a influência de alterações ambientais sobre esta família de hormônios, especialmente em espécies não-salmonídeos (Pérez-Sánchez et al., 1994; Figueroa et al., 1994, 1997, 2005; Riley et al., 2003; Vargas-Chacoff et al., 2009; Fiszbein et al., 2010), e apenas um estudo com uma espécie potamódroma sulamericana, *Salminus hilarii* (Honji, 2007), foi realizado, comparando-se reprodutores de ambiente natural e de cativeiro. No presente trabalho, os anticorpos utilizados de *O. keta* e *S. aurata* foram específicos na identificação das células produtoras de GH, PRL e SL em *S. parahybae*, e não foi observada nenhuma reação cruzada com nenhuma outra célula da ADH. Além disso, a distribuição destas células foi semelhante ao já descrito para outras espécies de teleósteos (revisões: Kawauchi & Sower, 2006; Agulleiro et al., 2006; Takei & Loretz, 2006; Yaron & Sivan, 2006). Os pesos moleculares estimados para GH (21KDa), PRL (22KDa) e SL (26KDa) na hipófise de *S. parahybae*, estão próximos ao identificado para outras espécies de teleósteos, como por exemplo, para *Cichlasoma dimerus* (GH: 25,5KDa; PRL: 23KDa; SL: 28 e 32KDa) (Pandolfi et al., 2009a, b), para *Odontesthes bonariensis* (GH: 23KDa) (Stefano et al., 1999) e *Dicentrarchus labrax* (GH: 21KDa; PRL: 23KDa; SL: 24 e 28KDa) (de Celis et al., 2004) e para Siluriformes, apenas o GH (22-23KDa) em *Clarias gariepinus* (Siluriformes) foi caracterizado por este método (Berghman et al., 1996).

A variação de GH durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae* demonstrou claramente que este hormônio sofre alterações durante a maturação gonadal, com maiores valores da análise semiquantitativa observados nos estádios vitelogênico e reprodução se comparados aos estádios pré-vitelogênico e regressão. Em *S. aurata*, também foram identificadas variações de expressão de proteínas de GH durante as diferentes épocas do ano, com maior valor observado durante o verão, que é o período reprodutivo desta espécie, e baixos valores foram identificados durante a época de inverno (Vargas-Chacoff et al., 2009). O aumento do hormônio GH durante o período reprodutivo de uma espécie, também pode estar relacionado com o aumento da alimentação desses animais neste período, como descrito em algumas espécies de teleósteos (Holloway & Leatherland, 1998; Canosa et al., 2007). Adicionalmente, em *S. hilarii* uma espécie reofílica neotropical, provavelmente durante a primavera/verão (época reprodutiva), estes animais liberam mais GH se comparado ao período não reprodutivo, outono/inverno (Honji, 2007). Considerando que as fêmeas vitelogênicas de *S. parahybae* também foram coletadas durante o verão e durante o inverno estes animais apresentavam-se no estágio pré-vitelogênico, nossos dados foram consistentes com a variação do perfil de GH durante o ciclo reprodutivo.

Ainda neste sentido, o maior valor na análise semiquantitativa foi observado no grupo reprodução, sugerindo uma maior síntese e/ou liberação deste hormônio em *S. parahybae* neste estágio. Provavelmente, esta liberação foi devido ao *feedback* dos esteróides gonadais sobre o sistema *kisspeptina*/GnRH, que por sua vez, modularia a síntese e liberação também de GH, como sugerido para o  $\beta$ -LH nesta mesma espécie (descrito acima). Esta hipótese de *feedback*, principalmente em relação à modulação de GnRH nas células produtoras de GH em algumas espécies de teleósteos também foi demonstrada, como por exemplo em *C. auratus*, *O. bonariensis* e *Cyprinus carpio* (Lin et al., 1993; Stefano et al., 1999; Canosa et al., 2007, 2008). Adicionalmente, Canosa et al. (2008) apresentaram que os níveis de GH e LH aumentam em *C. auratus* quando estes animais estão próximos à ovulação, sugerindo que o GnRH está envolvido também na regulação de GH durante este período. Em *O. bonariensis*, foram identificados sítios de ligação de GnRH com células que expressam GH, demonstrando que o GnRH pode ter um papel neuroendócrino no controle de diferentes hormônios da ADH, além das GtHs (Stefano et al., 1999). Estudos adicionais do controle de GnRH nas células hipofisárias de *S. parahybae* começaram a ser realizados em nosso grupo de pesquisa.

No que diz respeito à PRL, vários estudos apontam que este hormônio está relacionado principalmente com os processos fisiológicos de osmorregulação em teleósteos, especialmente no mecanismo de absorção e/ou redução na permeabilidade de íons e de água,



nas superfícies osmorregulatórias (*i.e.*, brânquias) (Manzon, 2002; Sakamoto & McCormick, 2006). Além disso, o fotoperíodo e a temperatura são os fatores ambientais que mais influenciam os níveis de expressão gênica e hormonal da PRL em peixes (Manzon, 2002; Sakamoto & McCormick, 2006; Vargas-Chacoff et al., 2009; Onuma et al., 2010). Neste sentido, em *C. carpio*, particularmente o fotoperíodo foi considerado um neuromodulador relevante na cascata hormonal que ativa a síntese e a liberação de PRL, devido principalmente a modulação deste hormônio pela melatonina (Falcón et al., 2007). Em *C. dimerus*, os níveis de PRL foram significativamente maiores quando os animais foram expostos a fotoperíodo longo se comparado aos animais expostos a fotoperíodo curto, indicando também que a melatonina é um neuromodulador importante nesta espécie (Fiszbein et al., 2010). Em *S. parahybae*, as fêmeas foram expostas ao fotoperíodo natural da região, no entanto, o fator ambiental que parece ter mais influenciado na alteração de PRL durante o período reprodutivo do surubim do Paraíba foi a temperatura da água, pois a média anual nos viveiros foi de  $21,10 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ , podendo alcançar valores de  $28^{\circ}\text{C}$  no verão (época reprodutiva) e de  $19^{\circ}\text{C}$  no inverno (época não reprodutiva).

O aumento da densidade óptica do estágio pré-vitelogênico para o vitelogênico e posteriormente a queda no estágio regressão, adicionado a não alteração no grupo induzido à reprodução, se comparado aos estádios vitelogênico e regressão, sugere que a PRL está envolvida no ajuste de processos fisiológicos anteriores e posteriores à época reprodutiva de *S. parahybae* (logo, no *status* reprodutivo dos reprodutores), uma vez que, os animais utilizados neste estudo foram provenientes de cativeiro e, portanto, o processo de aclimação em cativeiro foi mínimo, somado ao fato desta piscicultura de conservação da CESP utilizar a água proveniente do Rio Paraíba do Sul, rio este, que pertence a Bacia do Paraíba do Sul e deste modo, a qualidade da água provavelmente não alterou a maior parte dos processos fisiológicos do surubim do Paraíba (*i.e.*, osmorregulação referente a diferentes ambientes e/ou qualidade de água).

A função fisiológica da SL em teleósteos não está totalmente estabelecida, pois, o mecanismo de ação ainda depende de cada espécie a ser considerada (revisão: Kaneko, 1996). Alguns estudos sugerem que SL está mais envolvida na maturação sexual se comparado com as influências das alterações ambientais nos processos fisiológicos, pois o perfil plasmático e a expressão hipofisária de SL aumentam concomitantemente com a maturação gonadal, como observado em *O. kisutch* (Rand-Weaver et al., 1992), *Salmo salar* (Ágústsson et al., 2003), *O. masou* (Bhandari et al., 2003) e *O. keta* (Onuma et al., 2010). Além do mais, poucos são os estudos que envolvem a fisiologia da SL em espécies não-salmonídeos, *i.e.*, *Sciaenops*

*ocellatus* e *Micropogonias undulatus* (Zhu & Thomas, 1997), *Siganus guttatus* (Ayson & Takemura, 2003), *S. aurata* (Vargas-Chacoff et al., 2009), *C. dimerus* (Fiszbein et al., 2010), *S. hilarii* (Honji, 2007), e o presente estudo, que sugere um importante papel fisiológico de SL em reprodutores de *S. parahybae* em cativeiro.

Durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae*, variações das células produtoras de SL foram observadas, ou seja, a densidade óptica de SL aumentou do estágio pré-vitelogênico para o vitelogênico diminuindo no estágio regressão, sugerindo um possível papel fisiológico deste hormônio durante o período reprodutivo do surubim do Paraíba. Mousa & Mousa (1999, 2000) também identificaram variações no perfil de SL em *O. niloticus* e *Mugil cephalus* durante o período reprodutivo destas espécies, nas quais, o perfil de SL aumentou durante a maturação e desova, sugerindo que a SL esteja envolvida no controle de alguns passos do processo reprodutivo, como por exemplo, esteroidogênese e mobilização energética (especialmente na mobilização de lipídios). Sabe-se também, que o processo de vitelogênese, demanda de um aumento dos níveis circulante de cálcio, devido o envolvimento deste cátion no processo de transporte da vitelogenina do fígado até os ovários e posteriormente, no desenvolvimento do embrião (Kakizawa et al., 1993, 1995; Kaneko, 1996; Lubzens et al., 2010), podendo ser sugerido para *S. parahybae* esta possível função fisiológica de SL durante o período reprodutivo (mobilização de cálcio). Adicionalmente, estudos metabólicos, principalmente em relação à mobilização de lipídios e ácidos graxos durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae* vem sendo desenvolvido em nosso laboratório.

A maior densidade óptica de SL em *S. parahybae* foi observada no grupo reprodução, sugerindo que a SL está intimamente relacionada com a reprodução nesta espécie, durante a maturação gonadal e após a indução artificial à reprodução em cativeiro. Em geral, a secreção de SL é controlada por neuro-hormônios hipotalâmicos, e um dos possíveis candidatos a esta modulação é o GnRH, como observado em *O. mykiss* e *C. dimerus* (Parhar & Iwata, 1994; Cánepa et al., 2008), e o MCH (hormônio concentrador de melanina), como identificado em *C. dimerus* (Cánepa et al., 2008).

Em resumo, o presente estudo com os métodos, imuno-histoquímico e *Western blot*, caracterizaram as diferentes células da adeno-hipófise de *S. parahybae* e forneceram uma base para futuros estudos sobre o controle hormonal de diferentes processos fisiológicos e comportamentais em teleósteos Neotropicais, mais especificamente nos bagres. Adicionalmente, ambas gonadotropinas,  $\beta$ -FSH e  $\beta$ -LH, possuem um papel significativo na regulação da maturação ovariana em *S. parahybae*, e a disfunção reprodutiva desta espécie em cativeiro, ou seja, na maturação final e ovulação, provavelmente é devido a uma falha no

estímulo da síntese e/ou liberação de  $\beta$ -LH, sugerindo uma análise específica no sistema *kisspeptina*/GnRH durante o estágio vitelogênico. Os resultados aqui obtidos acerca das GtHs, adicionados aos futuros estudos sobre o sistema *kisspeptina*/GnRH, podem fornecer subsídios para o entendimento desse quebra-cabeça da disfunção endócrina do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas em espécies de peixes reofílicos migradores, confinados em cativeiro. Além disso, as variações observadas nos hormônios da família do hormônio de crescimento (GH, PRL e SL) durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae*, sugerem que estes hormônios estejam envolvidos indiretamente na reprodução, com um papel fisiológico na regulação e/ou na modulação de mecanismos associados à reprodução, ou seja, no *status* reprodutivo do surubim do Paraíba. Ao mesmo tempo, estes hormônios podem apresentar uma função na transdução de sinal decorrente dos fatores ambientais, como por exemplo, a temperatura e fotoperíodo.

## 5. Agradecimentos

Os autores agradecem principalmente ao Dr. Akio Shimizu (*National Research Institute of Fisheries Sciences, Fisheries Research Agency, Kanazawa, Yokohama, Japan*) pela gentileza na doação dos anticorpos para  $\beta$ -LH e  $\beta$ -FSH; ao Dr. H. Kawauchi (*School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Iwate, Japan*) pela gentileza na doação dos anticorpos para GH e PRL; ao Dr. A. Astola (*Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Spain*) pela gentileza na doação dos anticorpos para SL. A Dra. Fabiana Lo Nostro (*Universidad de Buenos Aires*), pelo auxílio nas análises de imuno-histoquímica e de *Western blot*, além das valiosas sugestões nos resultados. Os autores também agradecem a CESP e a seus funcionários pelo auxílio nas instalações e manutenção dos reprodutores em cativeiro. Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo: 2007/55494-7 e 2008/57687-0), e pelo Programa Santander de Bolsas de Mobilidade Internacional de Pós-Graduação.

## 6. Referências bibliográficas

Agostinho, A. A.; Gomes, L. C.; Suzuki, H. I. & Júlio, H. F. 2003. Migratory fish from the upper Paraná River Basin, Brazil. Pp: 19-99. In: Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C. & Baer, A. (Eds.). *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*. World Fisheries Trust. The World Bank and the International Development Research Centre. Victoria.

- Agulleiro, B.; Garcia-Hernández, M. P. & García-Ayala, A. 2006. Teleost adenohypophysis: morphofunctional and developmental aspects. Pp: 287-323. In: Reinecke, M.; Zaccane, G. & Kappor, B. G. (E.ds.). Fish Endocrinology. Science Publishers. volume 01.
- Ágústsson, T.; Sundell, K.; Sakamoto, T.; Ando, M. & Björnsson, B. 2003. Pituitary gene expression of somatolactin, prolactin and growth hormone during Atlantic salmon parr-smolt transformation. *Aquaculture* 222: 229-238.
- Aizen, J.; Kasuto, H. & Levavi-Sivan, B. 2007. Development of specific enzyme-linked immunosorbent assay for determining LH and FSH levels in tilapia, using recombinant gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153: 323-332.
- Aldridge, G. M.; Podrebarac, D. M.; Greenough, W. T. & Weiler, I. J. 2008. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J. Neurosci. Meth.* 172: 250-254.
- 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. *Comp. Biochem. Physiol.* 148A (Suppl. 1): S44.
- Ayson, F. & Takemura, A. 2003. Daily expression patterns for mRNAs of GH, PRL, SL, IGF-I and IGF-II in juvenile rabbitfish, *Siganus guttatus*, during 24-h light and dark cycles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 149: 261-268.
- Behmer, O. A.; Tolosa, E. M. C. & Neto, A. G. F. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART, São Paulo, Livraria Editora Ltda. 239p.
- Berghman, L. R.; Lescroart, O.; Roelants, I.; Ollevier, F.; Kühn, E. R.; Verhaert, P. D.; Loof, A. D.; Van-Leuven, F. & Vandesande, F. 1996. One-step immunoaffinity purification and partial characterization of hypophyseal growth hormone from the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Comp. Biochem. Physiol.* 113B: 773-780.
- Bhandari, R. K.; Taniyama, S.; Kitahashi, T.; Ando, H.; Yamauchi, K.; Zohar, Y.; Ueda, H. & Urano, A. 2003. Seasonal changes of responses to gonadotropin-releasing hormone analog in expression of growth hormone/ prolactin/ somatolactin genes in the pituitary of masu salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130: 55-63.
- Borella, M. I.; Venturieri, R. & Mancera, J. M. 2009. Immunocytochemical identification of adenohypophyseal cells in the pirarucu (*Arapaima gigas*), an Amazonian basal teleost. *Fish Physiol. Biochem.* 35: 3-16.
- Bromage, N.; Jones, J.; Randall, C.; Theush, M.; Davies, B.; Springate, J.; Duston, J. & Barker, G. 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of

- egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100: 141-166.
- Cánepa, M. M.; Pandolfi, M.; Maggese, M. C. & Vissio, P. G. 2006. Involvement of somatolactin in background adaptation of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *J. Exp. Zool.* 305A: 410-419.
- Cánepa, M.; Pozzi, A.; Astola, A.; Maggese, M. C. & Vissio, P. 2008. Effect of salmon melanin-concentrating hormone and mammalian gonadotropin-releasing hormone on somatolactin release in pituitary culture of *Cichlasoma dimerus*. *Cell Tissue Res.* 333: 49-59.
- Caneppele, D.; Honji, R. M.; Hilsdorf, A. W. S. & Moreira, R. G. 2009. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotrop. Ichthyol.* 7(4): 759-762.
- Canosa, L. F.; Chang, J. P. & Peter, R. E. 2007. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 151: 1-26.
- Canosa, L. F.; Stacey, N. & Peter, R. E. 2008. Changes in brain mRNA levels of gonadotropin-releasing hormone, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, and somatostatin during ovulatory luteinizing hormone and growth hormone surges in goldfish. *Am. J. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295: 1815-1821.
- de Celis, S. V.; Gomez-Requeni, P. & Perez-Sanchez, J. 2004. Production and characterization of recombinantly derived peptides and antibodies for accurate determinations of somatolactin, growth hormone and insulin-like growth factor-I in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 139: 266-277.
- Dittmer, A. & Dittmer, J. 2006.  $\beta$ -Actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis* 27: 2844-2845.
- Falcón, J.; Besseau, L.; Sauzet, S. & Boeuf, G. 2007. Melatonin effects on the hypothalamus-pituitary axis in fish. *Trends Endocrinol. Metabol.* 18(2): 81-88.
- Figuerola, J.; Molina, A.; Alvarez, M.; Villanueva, J.; Reyes, A.; León, G. & Krauskopf, M. 1994. Prolactin gene expression and changes of prolactin pituitary levels during the seasonal acclimatization of the carp. *Comp. Biochem. Physiol.* 108B: 551-560.
- Figuerola, J.; Reyes, A.; Ríos, M.; Vera, M. I. & Krauskopf, M. 1997. Effects of temperature and photoperiod on prolactin transcription in *Cyprinus carpio*. *Zool. Sci.* 14: 353-357.
- Figuerola, J.; San Martín, R.; Flores, C.; Grothusen, H. & Kausel, G. 2005. Seasonal modulation of growth hormone mRNA and protein levels in carp pituitary: evidence for two expressed genes. *J. Comp. Physiol.* 175B: 185-192.

- Fiszbein, A.; Cánepa, M.; Vázquez, G. R.; Maggese, C. & Pandolfi, M. 2010. Photoperiodic modulation of reproductive physiology and behavior in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Physiol. Behav.* 99: 425-432.
- Garavello, J. C. 2005. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotrop. Ichthyol.* 3(4): 607-623.
- García-Ayala, A.; Garcia-Hernández, M. P.; Quesada, J. A. & Agulleiro, B. 1997. Immunocytochemical and ultrastructural characterization of prolactin, growth hormonal and somatolactin cells from the Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*, Risso 1810). *Anat. Rec.* 247: 395-404.
- Garcia-Hernández, M. P.; García-Ayala, A.; Elbal, M. T. & Agulleiro, B. 1996. The adenohipophysis of Mediterranean yellowtail *Seriola dumerilii* (Risso, 1810): an immunocytochemical study. *Tissue & Cell* 28(5): 577-585.
- van Ginneken, V. J. T. & Maes, G. E. 2005. The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 15: 367-398.
- Govoroun, M.; Chyb, J. & Breton, B. 1998. Immunological cross-reactivity between rainbow trout GtH I and GtH II and their  $\alpha$  and  $\beta$  subunits: application to the development of specific radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111: 28-37.
- Grandi, G. & Chicca, M. 2004. Early development of the pituitary gland in *Ancipenser naccarii* (Chondrostei, Acipenseriformes): an immunocytochemical study. *Anat. Embryol.* 208: 311-321.
- Guzmán, J. M.; Rubio, M.; Ortiz-Delgado, J. B.; Klenke, U.; Kight, K.; Cross, I.; Sánchez-Ramos, I.; Riaza, A.; Rebordinos, L.; Sarasquete, C.; Zohar, Y. & Mañanós, E. L. 2009. Comparative gene expression of gonadotropins (FSH and LH) and peptide levels of gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) in the pituitary of wild and cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstocks. *Comp. Biochem. Physiol.* 153A: 266-277.
- Holloway, A. C. & Leatherland, J. F. 1998. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion in teleost fishes with emphasis on the involvement of gonadal sex steroids. *Rev. Fish Biol. Fish.* 8: 409-429.
- Honji, R. M. 2007. Caracterização endócrina durante o ciclo reprodutivo da tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae), em três ambientes distintos: natural, impactado e cativo. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 190p.

- Honji, R. M.; Caneppele, D.; Hilsdorf, A. W. S. & Moreira, R. G. 2009. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). *Environ. Biol. Fish.* 85(3): 207-208.
- Kakizawa, S.; Kaneko, T.; Hasegawa, S. & Hirano, T. 1993. Activation of somatolactin cells in the pituitary of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by low environmental calcium. *Gen. Comp. Endocrinol.* 91: 298-306.
- Kakizawa, S.; Kaneko, T.; Ogasawara, T. & Hirano, T. 1995. Changes in plasma somatolactin levels during spawning migration of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Fish Physiol. Biochem.* 14: 93-191.
- Kaneko, T. 1996. Cell biology of somatolactin. *Int. Rev. Cytol.* 169: 1-24.
- Kawauchi, H. & Sower, S. A. 2006. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148: 3-14.
- Lee, L. T. O.; Siu, F. K. Y.; Tam, J. K. V.; Lau, I. T. Y.; Wong, A. O. L.; Lin, M. C. M.; Vaudry, H. & Chow, B. K. C. 2007. Discovery of growth hormone-releasing hormones and receptors in nonmammalian vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 2133-2138.
- Levavi-Sivan, B.; Bogerd, J.; Mañanós, E. L.; Gómez, A. & Lareyre, J. J. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 412-437.
- Lin, X. W.; Lin, H. R. & Peter, R. E. 1993. Growth hormone and gonadotropin secretion in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): in vitro interactions of gonadotropin-releasing hormone, somatostatin and dopamine agonist apomorphine. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89: 62-71.
- Lubzens, E.; Young, G.; Bobe, J. & Cerdà, J. 2010. Oogenesis in teleost: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 367-389.
- Lucas, M. C. & Baras, E. 2001. Migration of freshwater fishes. Blackwell Science. 420p.
- Mancera, J. M. & McCornick, S. D. 2007. Role of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol in teleost osmoregulation. Pp: 497-515. In: Baldisserotto, B.; Mancera, J. M. & Kapoor, B. G. (Eds.). *Fish osmoregulation*. Science Publisher.
- Manzon, L. A. 2002. The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125: 291-310.
- Mousa, M. A. & Mousa, S. A. 1999. Immunocytochemical study on the localization and distribution of the somatolactin cells in the pituitary gland and the brain of *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 197-211.

- Mousa, M. A. & Mousa, S. A. 2000. Implication of somatolactin in the regulation of sexual maturation and spawning of *Mugil cephalus*. *J. Exp. Zool.* 287: 62-73.
- Mylonas, C. C.; Fostier, A. & Zanuy, S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 516-534.
- Onuma, T. A.; Ban, M.; Makino, K.; Katsumata, H.; Hu, W.; Ando, H.; Fukuwaka, M.; Azumaya, T. & Urano, A. 2010. Changes in gene expression for GH/PRL/SL family hormones in the pituitaries of homing chum salmon during ocean migration through upstream migration. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166: 537-548.
- Pandolfi, M.; Cánepa, M.; Mejjide, F. J.; Alonso, F.; Vázquez, G. R.; Maggese, M. C. & Vissio, P. G. 2009b. Studies on the reproductive and developmental biology of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Biocell* 33(1): 1-18.
- Pandolfi, M.; Lo Nostro, F. L.; Shimizu, A.; Pozzi, A. G.; Mejjide, F. J.; Vazquez, G. R. & Maggese, M. C.. 2006. Identification of immunoreactive FSH and LH cells in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* during the ontogeny and sexual differentiation. *Anat. Embryol.* 211: 355-365.
- Pandolfi, M.; Muñoz-Cueto, J. A.; Lo Nostro, F. L.; Downs, J. L.; Paz, D. A.; Maggesse, M. C. & Urbanski, H. F. 2005. GnRH systems of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae) revisited: a localization study with antibodies and riboprobes to GnRH-associated peptides. *Cell Tissue Res.* 321: 219-232.
- Pandolfi, M.; Paz, D. A.; Maggese, C.; Mejjide, F. J. & Vissio, P. 2001b. Immunocytochemical localization of different cell types in the adenohypophysis of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840). *Biocell* 25(1): 35-42.
- Pandolfi, M.; Paz, D. A.; Maggese, C.; Ravaglia, M. & Vissio, P. 2001a. Ontogeny of immunoreactive somatolactin, prolactin and growth hormone secretory cells in the developing pituitary gland of *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Anat. Embryol.* 203: 461-468.
- Pandolfi, P.; Pozzi, A.; Cánepa, M.; Vissio, P. G.; Shimizu, A.; Maggese, M. C. & Lobo, G. 2009a. Presence of  $\beta$ -follicle-stimulating hormone and  $\beta$ -luteinizing hormone transcripts in the brain of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes: Cichlidae). *Neuroendocrinology* 89: 27-37.
- Parhar, I. S. & Iwata, M. 1994. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons project to growth hormone and somatolactin cells in the steelhead trout. *Histochemistry* 102: 195-203.



- Pérez-Sánchez, J.; Martí-Palanca, H. & Le Bail, P. Y. 1994. Seasonal changes in circulating growth hormone (GH), hepatic GH-binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine fish, gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Fish Physiol. Biochem.* 13: 199-208.
- Rand-Weaver, M.; Swanson, P.; Kawauchi, H. & Dickhoff, W. W. 1992. Somatolactin, a novel pituitary protein: purification and plasma levels during reproductive maturation of coho salmon. *J. Endocrinol.* 133: 393-403.
- Riley, L.; Hirano, T. & Grau, E. 2003. Effects of transfer from seawater to fresh water on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis and prolactin in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 136B: 647-655.
- Romero-Calvo, I.; Ocón, P.; Martínez-Moya, P.; Suárez, M. D.; Zarzuelo, A.; Martínez-Augustin, O. & Medina, F. S. 2010. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* 401: 318-320.
- Sakamoto, T. & McCormick, S. D. 2006. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147: 24-30.
- Sánchez-Cala, F. S.; Portillo, A.; Martín del Río, M. P. & Mancera, J. M. 2003. Immunocytochemical characterization of adenohypophyseal cells in the greater weever fish (*Trachinus draco*). *Tissue & Cell* 35: 169-178.
- Segura-Noguera, M. M.; Laiz-Carrión, R.; Martín del Río, M. P. & Mancera, J. M. 2000. An immunocytochemical study of the pituitary gland of the white seabream (*Diplodus sargus*). *Histochem. J.* 32: 733-742.
- Shimizu, A.; Sakai, T.; Nashida, K. & Honda, H. 2003a. Universal antisera for immunocytochemical identification of two different gonadotrophs in acanthopterygian fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 29: 275-287.
- Shimizu, A.; Tanaka, H. & Kagawa, H. 2003b. Immunocytochemical applications of specific antisera raised against synthetic fragment peptides of mummichog GtH subunits: examining seasonal variations of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in the mummichog and applications to other acanthopterygian fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132: 35-45.
- Silva, F. S. D.; Deus, J. R. M. & Hilsdorf, A. W. S. 2006. The upper reached ichthyofauna of the Tietê River, São Paulo, Brazil: aspects of their diversity and conservation. *Biodivers. Conserv.* 15: 3569-3577.
- Stefano, A. V.; Vissio, P. G.; Paz, D. A.; Somoza, G. M.; Maggese, M. C. & Barrantes, G. E. 1999. Colocalization of GnRH binding sites with gonadotropin-, somatotropin-,

- somatolactin-, and prolactin-expressing pituitary cells of the pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 116: 133-139.
- Swanson, P.; Dickey, J. T. & Campbell, B. 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 53-59.
- Takei, Y. & Loretz, C. A. 2006. Endocrinology. Pp: 271-318. In: Evans, D. H. & Claiborne, J. B. (Eds.). *The Physiology of Fish*. 3ed. Taylor & Francis Group.
- Tam, J. K. V.; Lee, L. T. O. & Chow, B. K. C. 2007. PACAP-related peptide (PRP) – molecular evolution and potential functions. *Peptides* 28: 1920-1929.
- Tam, J. K. V.; Lee, L. T. O.; Cheng, C. H. K. & Chow, B. K. C. 2011. Discovery of a new reproductive hormone in teleosts: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-related peptide (PRP). *Gen. Comp. Endocrinol.* (*in press*). DOI: 10.1016/j.ygcen.2011.06.003.
- Taranger, G. L.; Carrillo, M.; Schulz, R. W.; Fontaine, P.; Zanuy, S.; Felip, A.; Weltzien, F.; Dufour, S.; Karlsen, Ø.; Norberg, B.; Andersson, E. & Hansen, T. 2010. Control of puberty in farmed fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 483-515.
- Vargas-Chacoff, L.; Astola, A.; Arjona, F. J.; Martín del Río, M. P.; García-Cózar, F.; Mancera, J. M. & Martínez-Rodríguez, G. 2009. Gene and protein expression for prolactin, growth hormone and somatolactin in *Sparus aurata*: seasonal variations. *Comp. Biochem. Physiol.* 153B: 130-135.
- Vazzoler, A. E. A. M. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. EDUEM, Maringá. 169p.
- Vissio, P. G.; Paz, D. A. & Maggese, M. C. 1996. The adenohipophysis of the swamp eel, *Synbranchus marmoratus*: an immunocytochemical analysis. *Biocell* 20: 155-61.
- Vissio, P. G.; Somoza, G. M.; Maggese, M. C.; Paz, D. A. & Strüssmann, C. A. 1997. Structure and cell type distribution in the pituitary gland of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Fisher. Sci.* 63(1): 64-68.
- Yaron, Z. & Sivan, B. 2006. Reproduction. Pp: 243-386. In: Evans, D. H. & Claiborne, J. B. (Eds.). *The physiology of fish*. Taylor & Francis. 3ed.
- Zar, J. H. 2010. *Biostatistical analysis*. New Jersey. Prentice Hall. 718p.
- Zhu, Y. & Thomas, P. 1997. Studies on the physiology of somatolactin secretion in red drum and Atlantic croaker. *Fish Physiol. Biochem.* 17: 271-278.
- Zmora, N.; Kazeto, Y.; Kumar, R. S.; Schulz, R. W. & Trant, J. M. 2007. Production of recombinant channel catfish (*Ictalurus punctatus*) FSH and LH in S2 *Drosophila* cell line and an indication of their different actions. *J. Endocrinol.* 194: 407-416.

- 
- Zmora, N.; Kumar, S.; Kazeto, Y. & Trant, J. M. 2003. Production of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) recombinant gonadotropins using the S2 *Drosophila* cell line system. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 475-477.
- Zohar, Y. & Mylonas, C. C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99-136.
- Zohar, Y.; Muñoz-Cueto, J.; Elizur, A. & Kah, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 438-455.





**TABELAS: CAPÍTULO 3**





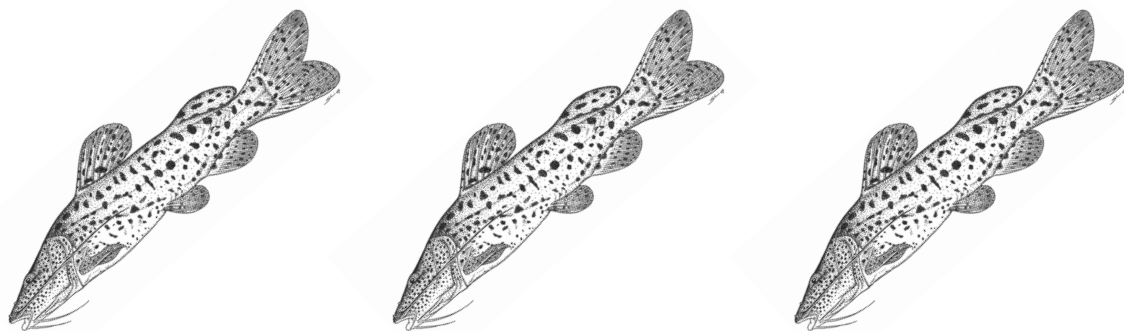
**Tabela 1.** *Steindachneridion parahybae* – Distribuição morfométrica e ponderal e Índice Gonadossomático (IGS) por estágio de maturação. Média  $\pm$  erro padrão da média.

Estádio de maturação	N	Comprimento padrão (cm): min-max	Comprimento padrão médio (cm):	Massa corpórea média (g)	IGS
Pré-vitelogênico	28	29,00 - 40,50	35,93 $\pm$ 0,64	698,52 $\pm$ 29,50	0,40 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>
Vitelogênico	22	29,50 - 40,50	34,50 $\pm$ 0,55	596,66 $\pm$ 25,35	1,59 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>
Regressão	18	30,00 - 38,50	33,61 $\pm$ 0,46	603,85 $\pm$ 29,97	0,57 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
Reprodução	4	32,50 - 33,00	33,07 $\pm$ 0,09	541,67 $\pm$ 8,08	1,61 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>

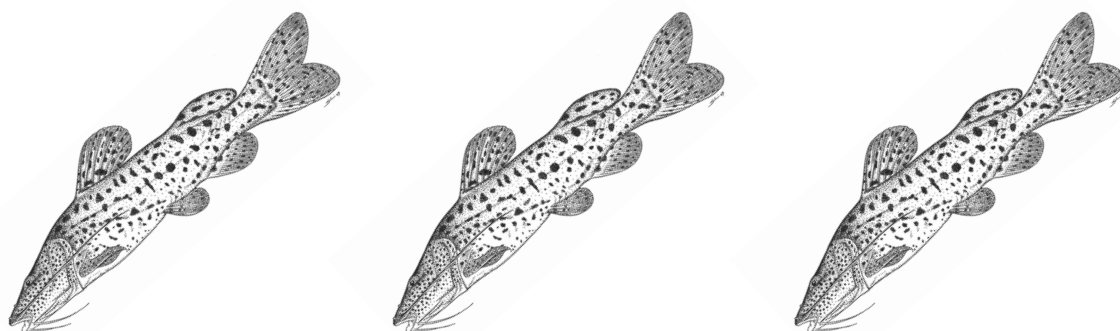
<sup>a, b</sup> Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes.



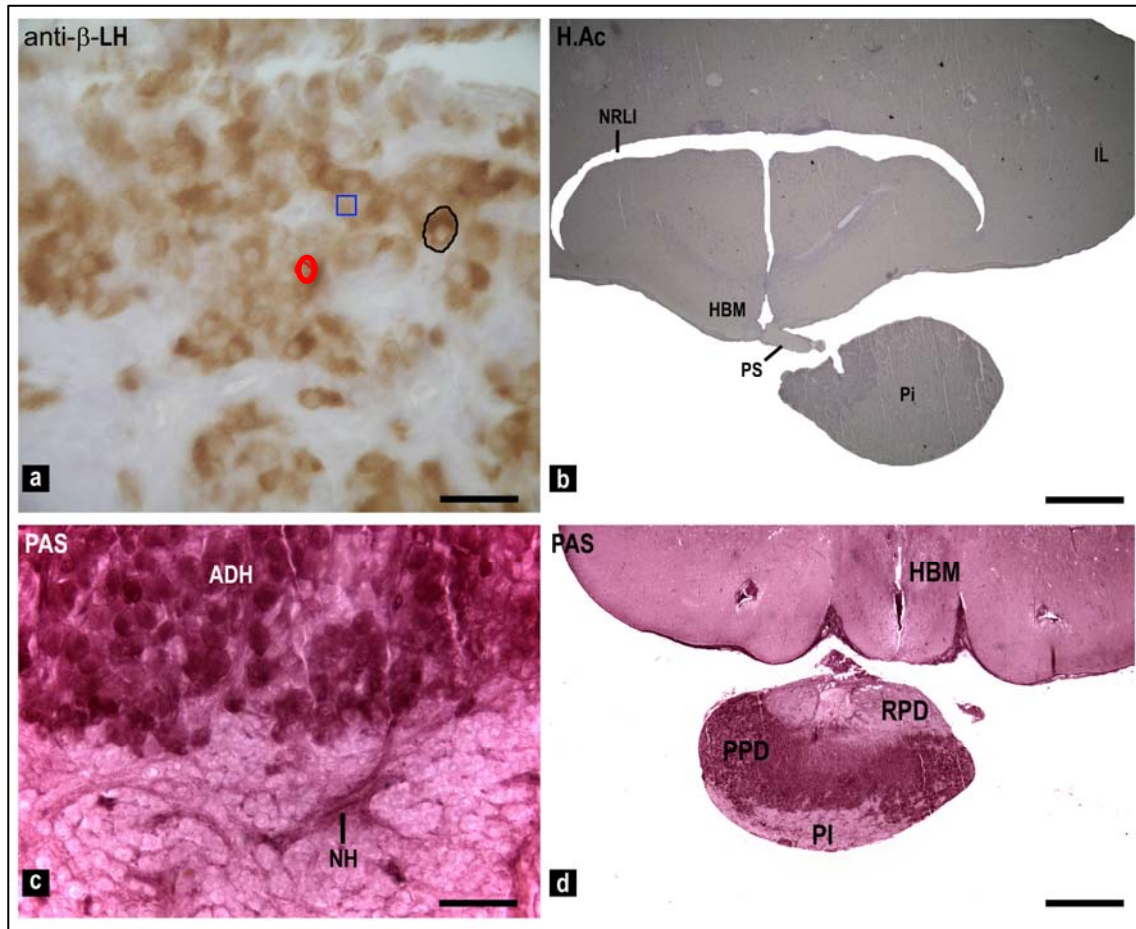




**FIGURAS: CAPÍTULO 3**

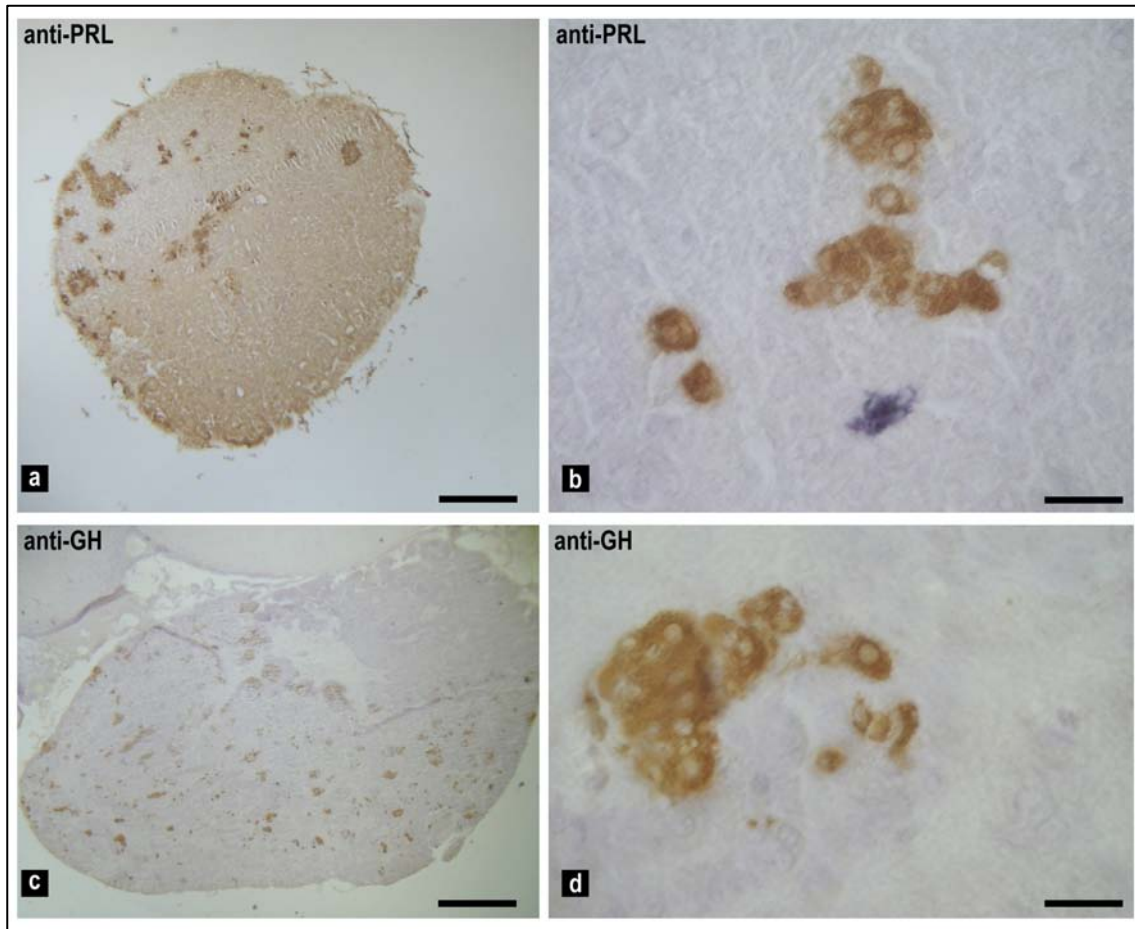






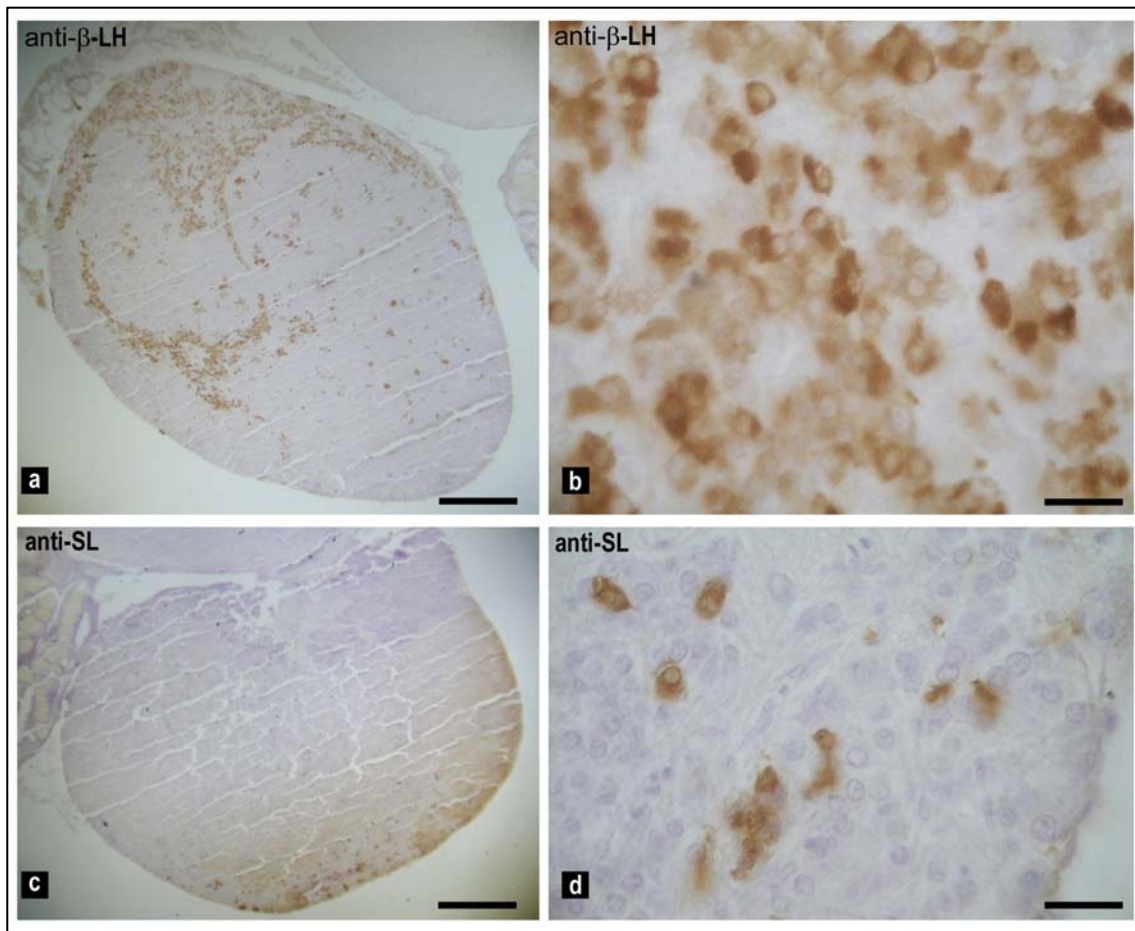
**Fig. 1.** *Steindachneridion parahybae* (exemplar no estágio de desenvolvimento gonadal: vitelogenético): Descrição de cortes histológicos e reação de imuno-histoquímica no encéfalo e na hipófise do surubim do Paraíba. a) Fotomicrografia de células-ir com o anticorpo  $\beta$ -LH de *F. heteroclitus* (anti- $\beta$ -LH). Exemplo de medição de densidade óptica (quadrado azul) e área celular (círculo preto) e nuclear (círculo vermelho); b) Região do hipotálamo médio basal (HBM) apresentando a direta conexão do encéfalo com a hipófise (Pi) através do pedúnculo hipofisário (PS). Coloração: hematoxilina ácida. IL, lobo inferior; NRLI, recesso lateral do núcleo lateral; c) Principal divisão da hipófise: neuro-hipófise (NH) e adeno-hipófise (ADH). Coloração: ácido periódico de Schiff (PAS); d) Principais subdivisões da adeno-hipófise: *rostral pars distalis* (RPD), *proximal pars distalis* (PPD) e *pars intermedia* (PI). Coloração: ácido periódico de Schiff (PAS). Barra: 10 $\mu$ m (a; c) e 400 $\mu$ m (b; d).





**Fig. 2.** *Steindachneridion parahybae* (exemplar no estágio de desenvolvimento gonadal: vitelogenético): Reação de imuno-histoquímica na hipófise do surubim do Paraíba. a) Resultado da reação com anti-prolactina de *O. keta* (anti-PRL); b) Detalhe das células-ir com anti-PRL; c) Resultado da reação com anti-hormônio de crescimento de *O. keta* (anti-GH); d) Detalhe das células-ir com anti-GH. Barra: 400µm (a; c) e 10µm (b; d).

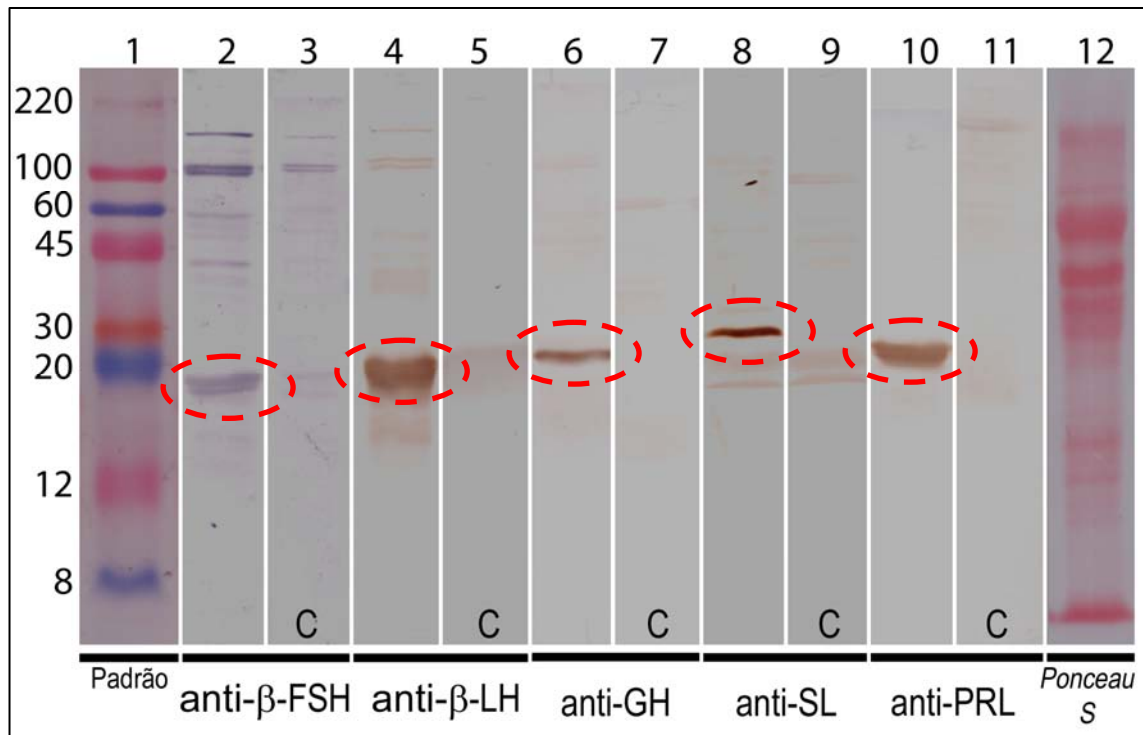




**Fig. 3.** *Steindachneridion parahybae* (exemplar no estágio de desenvolvimento gonadal: vitelogenético): Reação de imuno-histoquímica na hipófise do surubim do Paraíba. a) Resultado da reação com anti-β-hormônio luteinizante de *F. heteroclitus* (anti-β-LH); b) Detalhe das células-ir com anti-β-LH; c) Resultado da reação com anti-somatolactina de *S. aurata* (anti-SL); d) Detalhe das células-ir com anti-SL. Barra: 400μm (a; c) e 10μm (b; d).

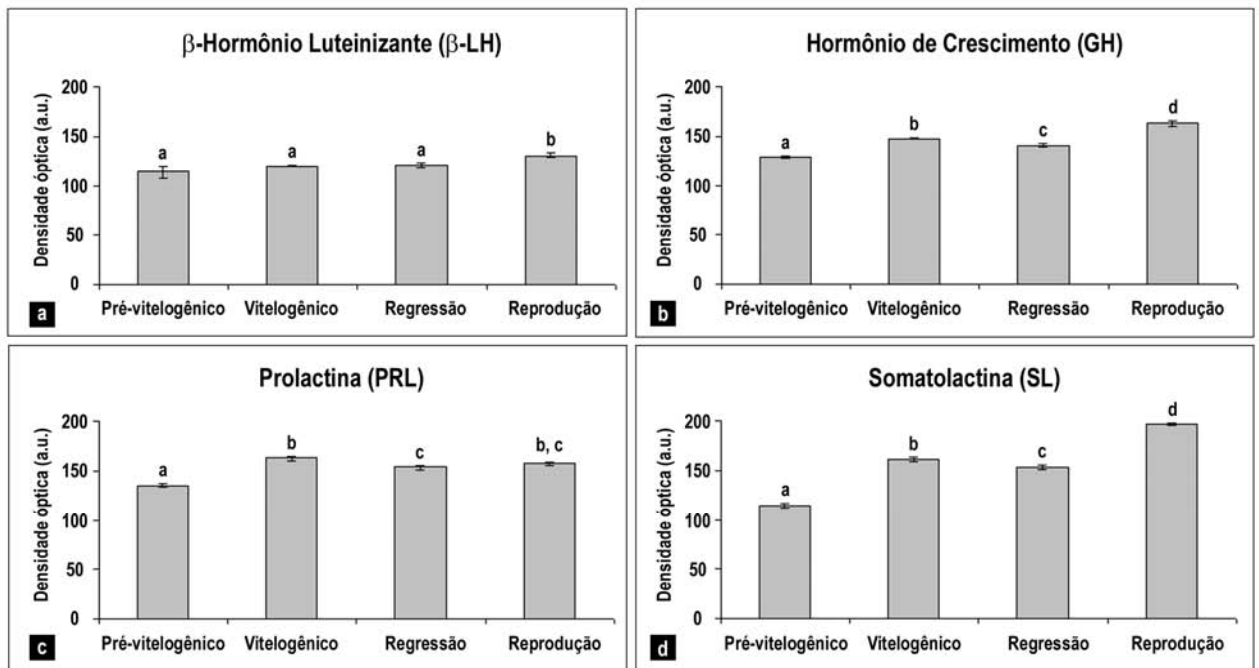






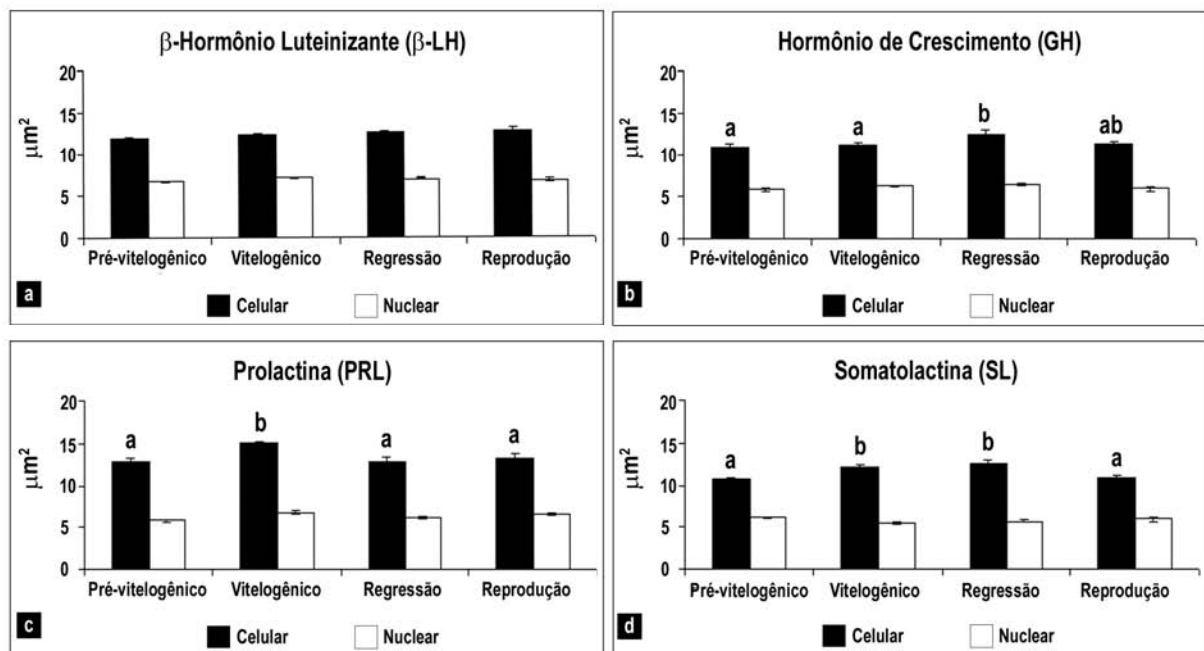
**Fig. 4.** *Steindachneridion parahybae* (exemplar no estágio de desenvolvimento gonadal: vitelogênico): Análise de *Western blot* utilizando homogeneizados de hipófises incubados com os anticorpos: anti- $\beta$ -hormônio-folículo estimulante de *F. heteroclitus* (anti- $\beta$ -FSH) (linhas: 2, 3); anti- $\beta$ -hormônio-luteinizante de *F. heteroclitus* (anti- $\beta$ -LH) (linhas: 4, 5); anti-hormônio de crescimento de *O. keta* (anti-GH) (linhas: 6, 7); anti-somatolactina de *S. aurata* (anti-SL) (linhas: 8, 9); anti-prolactina de *O. keta* (anti-PRL) (linhas: 10, 11). Marcador molecular padrão (linha 1). A coloração com *Ponceau S* (linha 12) foi utilizada como controle de qualidade na transferência das proteínas para a membrana no *Western blot*, e como meio alternativo para imuno-transferência, além de normalizador desta análise. **C**, controle.





**Fig. 5.** *Steindachneridion parahybae*: variação da análise semiquantitativa de densidade óptica de células-ir durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução em cativeiro. a) densidade óptica de células-ir com anti- $\beta$ -hormônio luteinizante (anti- $\beta$ -LH); b) densidade óptica de células-ir com anti-hormônio de crescimento (anti-GH); c) densidade óptica de células-ir com anti-prolactina (anti-PRL); d) densidade óptica de células-ir com anti-somatolactina (anti-SL). Dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Valores seguidos por diferentes letras (a, b) são significativamente diferente entre os estádios de maturação gonadal.





**Fig. 6.** *Steindachneridion parahybae*: variação da análise semiquantitativa do diâmetro celular (barra cinza) e nuclear (barra branca) de células-ir durante o ciclo reprodutivo e após a reprodução em cativeiro. a) células-ir com anti-β-hormônio luteinizante (anti-β-LH); b) células-ir com anti-hormônio de crescimento (anti-GH); c) células-ir com anti-prolactina (anti-PRL); d) células-ir com anti-somatolactina (anti-SL). Dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Valores seguidos por diferentes letras (a, b) são significativamente diferente entre os estádios de maturação gonadal.





Leonardo Gastón Guilgur

# 4

## *CAPÍTULO*

---

Caracterização, distribuição e localização das diferentes formas do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) no encéfalo e na hipófise de *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução em cativeiro.

Honji, R. M.; Caneppele, D.; Pandolfi, M. & Moreira, R. G.

**Caracterização, distribuição e localização das diferentes formas do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) no encéfalo e na hipófise de *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução em cativeiro.**

Honji, R. M.<sup>1</sup>; Caneppele, D.<sup>2</sup>; Pandolfi, M.<sup>3</sup> & Moreira, R. G.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, Trav. 14, 321, 05508-090, São Paulo - SP, Brasil. \*e-mail: [renatagm@ib.usp.br](mailto:renatagm@ib.usp.br)

<sup>2</sup> – Companhia Energética de São Paulo (CESP), Unidade de Hidrobiologia e Aquicultura, Rodovia dos Tamoios, km 38. 12260-000, Brasil.

<sup>3</sup> – Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (C1428EHA), Buenos Aires, B.A., Argentina.

**Resumo**

*Steindachneridion parahybae* é um bagre de água doce, endêmico da Bacia do Paraíba do Sul, e está criticamente ameaçado de extinção. Além dessa situação crítica, este teleósteo apresenta sérios problemas endócrinos relacionados com a reprodução quando em condições de cultivo. O conhecimento do sistema das diferentes formas de hormônio-liberador de gonadotropinas (GnRH) em uma espécie, pode contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos no controle fisiológico da maturação gonadal e desova, pois, é sugerido que a disfunção endócrina que ocorre em espécies neotropicais com bloqueio reprodutivo em cativeiro, provavelmente é decorrente de uma falha no sistema de GnRHs. Devido a essa importância, a distribuição dos neurônios que expressam as diferentes formas de GnRH e suas respectivas fibras, foram estudados no encéfalo e na hipófise de *S. parahybae* durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução em cativeiro. Neurônios imuno-reativos (ir) com cfGnRH (*catfish* GnRH) foram identificados em toda região ventral do telencéfalo e nas principais áreas do diencéfalo (especialmente no hipotálamo), incluindo fibras-ir na hipófise. A segunda forma de neurônios-ir GnRH identificada no encéfalo de *S. parahybae*, foi cGnRH-II (*chicken* GnRH-II), restrito ao cérebro médio, próximo ao terceiro ventrículo, e não alcançam a hipófise. Estes resultados indicam que o cfGnRH é responsável



pelo controle endócrino da reprodução no surubim do Paraíba, principalmente estimulando a liberação das gonadotropinas na hipófise, e que o cGnRH-II, pode agir como neuromodulador e/ou neurotransmissor no encéfalo. Adicionalmente, o sistema cfGnRH em *S. parahybae*, durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução, se alteram em cativeiro, sugerindo que este ambiente afeta este sistema, e que o insucesso na reprodução neste ambiente pode ser devido a alguma disfunção na liberação do GnRH e/ou em outro nível do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Além do mais, os peptídeos associados ao GnRH (GAPs), co-localizam-se com os seus respectivos GnRHs, cfGAP-cfGnRH na região ventral do telencéfalo e nas principais áreas do diencéfalo e cGAP-II-cGnRH-II, restrito ao cérebro médio, reforçando a idéia de que os anticorpos para GAPs, são ferramentas valiosas nos estudos do sistema de GnRH, evitando os problemas de reações-cruzadas eventualmente observados quando são utilizados somente os anticorpos para GnRHs.

## 1. Introdução

A maturação gonadal é primariamente regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, e é bem estabelecido na literatura que em todos os vertebrados, a secreção de gonadotropinas (GtHs), hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), é modulada por peptídeos hipotalâmicos, principalmente pelo hormônio-liberador de gonadotropinas (GnRH). O decapeptídeo GnRH, integra os estímulos externos e internos no controle da reprodução, tendo portanto, um papel central no desenvolvimento e manutenção das funções reprodutivas em vertebrados (Gorbman & Sower, 2003; Guilgur et al., 2006; Kah et al., 2007; Okubo & Nagahama, 2008; Mylonas et al., 2010; Zohar et al., 2010). Além disso, o GnRH age como neuromodulador do processo reprodutivo (Oka, 1997), pois, a administração exógena de GnRH pode afetar o comportamento reprodutivo em muitas espécies (Dubois et al., 2002; Somoza et al., 2002a; Zohar et al., 2010). Apesar do sistema de GnRH estar presente em todos os vertebrados, diferenças morfológicas entre os grupos são observadas, uma vez que, o GnRH atinge as células gonadotrópicas indiretamente via sistema porta hipotálamo-hipofisário (em tetrápodos) ou diretamente via terminações axonais (em teleósteos) (Dubois et al., 2002; Gorbman & Sower, 2003; Guilgur et al., 2006; Kah et al., 2007; Okubo & Nagahama, 2008; Levavi-Sivan et al., 2010; Zohar et al., 2010).

Apenas para datar, 25 diferentes formas de GnRH foram identificadas em vertebrados e invertebrados com base na estrutura do DNA da molécula, sendo que, as diferentes formas moleculares de GnRH são comumente conhecidas pelo nome da espécie em que foi primeiramente caracterizada (Sherwood & Adams, 2005; Guilgur et al., 2006; Zhang et al.,

2008; Zohar et al., 2010). Em todas as classes de vertebrados, de agnatas a mamíferos, a presença de GnRH foi identificada (revisões: Dubois et al., 2002; Somoza et al., 2002a; Gorbman & Sower, 2003; Guilgur et al., 2006; Kah et al., 2007; Okubo & Nagahama, 2008; Zohar et al., 2010). Inicialmente, era considerado que em encéfalos de vertebrados, uma simples forma de GnRH estava presente. Atualmente, devido a diversidade de formas moleculares de GnRH descoberto, sabe-se que duas ou três diferentes formas de GnRH estão presentes em uma única espécie, e que não é restrito apenas a teleósteos, levantando-se a questão sobre o preciso papel das múltiplas formas de GnRH no controle da reprodução, e em outros processos fisiológicos correlatos. Além disso, interessante, todas as diferentes formas moleculares de GnRH apresentam peptídeos associados ao GnRH (GAPs), que são oligopeptídeos, maiores que o próprio GnRH, mais específicos, e co-localizam-se com os neurônios que sintetizam o GnRH, sugerindo que os GAPs são ferramentas valiosas na identificação do sistema de GnRH (Zandbergen et al., 1995; Montaner et al., 2001; González-Martínez et al., 2001, 2002a, b, 2004; Pandolfi et al., 2005).

Com mais de 25000 espécies viventes, 62 ordens e 515 famílias, os peixes compreendem o grupo mais diverso entre os vertebrados (Nelson, 2006). O primeiro GnRH descrito em teleósteos foi o de salmão (Sherwood et al., 1983), e desde então, vários estudos têm identificado diferentes formas de GnRH em outras espécies de teleósteos (Somoza et al., 2002a; Lethimonier et al., 2004; Guilgur et al., 2006; Kah et al., 2007; Okubo & Nagahama, 2008; Zohar et al., 2010). Duas diferentes formas têm sido observadas em Siluriformes (Ngamvongchon et al., 1992; Bogerd et al., 1994; Zandbergen et al., 1995; Dubois et al., 2001) e em Salmoniformes (Sherwood et al., 1983; Sherwood & Adams, 2005). Três diferentes formas de GnRH foram observadas em várias espécies de Perciformes (Powell et al., 1994; González-Martínez et al., 2002a; Pandolfi et al., 2005), Characiformes (Powell et al., 1997), Clupeiformes (Carolsfeld et al., 2000), Beloniformes (Okubo et al., 2000), Pleuronectiformes (Amano et al., 2002), Scorpaeniformes (Collins et al., 2001), Synbranchiformes, Atheriniformes e Cyprinodontiformes (Somoza et al., 2002b), sugerindo que este padrão (três formas) é prevalecente no grupo de teleósteos. Adicionalmente, diferenças na distribuição neuroanatômica dos diferentes tipos de GnRH e na inervação deste sistema na hipófise em teleósteos, principalmente na adeno-hipófise, próximo as células gonadotrópicas, são observadas em várias espécies (Zohar et al., 2010), questionando assim, qual (is) formas de GnRHs está (ão) relacionada (s) com a modulação de FSH e LH em teleósteos, além de outro possível papel fisiológico para este neuropeptídeo (neurotransmissor e/ou neuromodulador).

Estas características dos teleósteos têm atraído especial atenção para as investigações sobre o GnRH neste grupo. Estas investigações são importantes para a compreensão dos mecanismos referentes à evolução dos genes de GnRHs em vertebrados (Morgan & Millar, 2004; Guilgur et al., 2006; Kah et al., 2007; Okubo & Nagahama, 2008; Zohar et al., 2010), pois esta nova visão do sistema de GnRHs surgiu progressivamente de numerosos estudos comparativos em todas as classes de vertebrados, devendo ser considerado ainda que, em geral, os peixes (particularmente os teleósteos), muitas vezes desempenham um papel importante na mudança de paradigmas na área de endocrinologia reprodutiva (Zohar et al., 2010). Além disso, estes estudos são importantes para orientar a aplicação de diferentes formas de GnRHs na aquicultura, pois várias espécies quando transferidas ao cativeiro, apresentam disfunções endócrinas severas, e não se reproduzem naturalmente (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010; Zohar et al., 2010). Este fato é ainda mais agravante, quando consideramos as espécies de teleósteos ameaçados de extinção, portanto, o sistema de GnRHs, é importante também na piscicultura de conservação de espécies ameaçadas (Zohar & Mylonas, 2001; Wikelski & Cooke, 2006; Mylonas et al., 2010; Zohar et al., 2010).

O Siluriforme Neotropical, surubim do Paraíba, *Steindachneridion parahybae*, é um bagre de água doce, endêmico da Bacia do Paraíba do Sul, Brasil (Garavello, 2005), seriamente ameaçada de extinção (Honji et al., 2009), e a sua biologia reprodutiva é pouco compreendida. Além disso, muitos dos problemas encontrados na piscicultura de conservação de *S. parahybae* no Brasil estão relacionados com as disfunções endócrinas apresentadas por estes animais, principalmente em relação à ausência da maturação final dos oócitos, quando as fêmeas são submetidas às condições de cativeiro. Assim sendo, o sucesso desta atividade é fortemente dependente do entendimento dos mecanismos envolvidos no controle fisiológico da maturação gonadal, ovulação e desova, quando estes animais estão em sistema de cultivo. Deste modo, o primeiro objetivo do presente estudo foi identificar os diferentes tipos de GnRH em fêmeas adultas de *S. parahybae* em cativeiro, assim como as precisas localizações das projeções de cada forma molecular de GnRH no encéfalo e na hipófise, determinando qual (is) forma (s) é (são) hipofisiotrópica nesta espécie. O segundo objetivo do estudo, foi analisar as diferentes formas de GnRH durante o ciclo reprodutivo anual e após a indução artificial à reprodução em cativeiro. Por fim, nós utilizamos os diferentes anticorpos GAPs disponíveis com os objetivos de verificar se estes anticorpos são ferramentas valiosas para os estudos do sistema de GnRHs em espécies próximas e distantes filogeneticamente, evitando os problemas de reações cruzadas eventualmente observadas quando utiliza-se somente os anticorpos para GnRH.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Desenho experimental e coleta dos animais

O experimento foi conduzido na Piscicultura da Companhia Energética de São Paulo (CESP) (23° 24' 53,71'' S e 45° 35' 59,82'' W), localizada no município de Paraibuna (São Paulo, Brasil). Em dezembro de 2007, cem fêmeas adultas de *S. parahybae*, nascidas e criadas na CESP (primeira geração, F1; Caneppele et al., 2009), foram randomicamente distribuídas em dois viveiros (200m<sup>2</sup>) nesta piscicultura (50 fêmeas/viveiro). Durante o período experimental, os animais foram alimentados diariamente “*ad libitum*” com ração comercial extrusada para carnívoros, com teor de proteína bruta de 40% e granulometria de 6mm de diâmetro (Purina TC 40). A concentração de oxigênio dissolvido na água foi monitorada diariamente com um oxímetro (Horiba – ModU10) que registrou também a temperatura da água.

No momento de cada coleta (mensalmente, exceto durante os meses de inverno), quatro animais foram amostrados aleatoriamente em cada viveiro, e transportados para o laboratório da CESP, onde foram anestesiados por imersão em água contendo benzocaína (*ethyl-p-aminobenzoate*) previamente solubilizada em etanol, na proporção de 1g/20L de água, e os dados morfométricos e ponderais foram registrados. Em seguida, os animais foram sacrificados por decapitação, seus ovários rapidamente removidos e pesados, para posteriormente ser calculado o índice gonadossomático (IGS) (Vazzoler, 1996). Concomitantemente à coleta das gônadas, o encéfalo e a hipófise (Fig. 1) foram também coletados fixados ou congelados dependendo de cada método a ser descrito a seguir. Os procedimentos adotados para sacrificar os animais neste estudo estão de acordo com o Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolo: 072/2008).

Para as análises das possíveis variações das diferentes formas de GnRH durante o ciclo reprodutivo foram consideradas as seguintes classificações dos estádios de maturação gonadal: pré-vitelogênico, vitelogênico e regressão. Estes estádios de maturação gonadal de *S. parahybae* foram confirmados através de ferramentas morfológicas e histológicas (dados estão descritos no Capítulo 2).

Para as análises das possíveis variações de GnRH no encéfalo de fêmeas de *S. parahybae* induzidas à reprodução em cativeiro, os animais foram induzidos artificialmente à reprodução na CESP (maiores detalhes da reprodução induzida de fêmeas de surubim do Paraíba foram descritas no Capítulo 5), e o encéfalo e a hipófise foram coletados e fixados

logo em seguida à extrusão a seco dos gametas (momento zero, após a extrusão dos gametas). Neste estudo, este grupo experimental foi denominado de “reprodução”.

### 2.2. Análise histológica do encéfalo

Para a identificação precisa das áreas e dos núcleos encefálicos de *S. parahybae*, levaram-se em consideração os atlas descritos para *Dicentrarchus labrax* (Cerdá-Reverter et al., 2001a, b, 2008), e a distribuição e expressão de GnRH no encéfalo para *Clarias gariepinus* (Siluriformes) (Zandbergen et al., 1995; Dubois et al., 2001). Cinco encéfalos de *S. parahybae* juntamente com a hipófise (Fig. 1) conectada através do pedúnculo hipofisário em cada estágio de maturação gonadal, foram removidos e fixados por 20–24 horas em solução de Bouin acético, desidratados com uma série crescente de diluições de etanol, diafanizadas em solução de xilol (*dimethylbenzene*), e infiltradas em Paraplast<sup>®</sup> (Erv-Plast, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda) de acordo com os procedimentos histológicos rotineiros (Behmer et al., 1976). Cortes seriados com 12µm foram obtidos (micrótomo – *Leica RM 2255*), montados em lâminas com poli-lisina (*Poly-Lysine Solution* – Sigma Diagnostics INS), diluída em 1:5 (em água destilada), e corados com hematoxilina-eosina, hematoxilina de *Carazzi* acidificada em ácido acético, e tricrômico de *Masson*. Os cortes preparados foram analisados e documentados, utilizando-se um sistema computadorizado de captura de imagens (microscópio de luz transmitida – *Leica DM 1000*, câmera fotográfica – *Leica DFC 295*, e programa de captura de imagem – *Leica Application Suíte Professional, LAS V3.6*).

### 2.3. Análise de imuno-histoquímica

Para identificar e localizar as diferentes formas de GnRHs no encéfalo e na hipófise de *S. parahybae*, os cortes seriados obtidos, foram processados conforme as técnicas rotineiras de imuno-histoquímica com amplificação de sinal (metodologia descrita em Fiszbein et al., 2010).

Os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em decrescentes diluições de etanol, e lavados com tampão PBS (*fosfate buffer saline*, pH 7,4). Em seguida o material foi submetido ao bloqueio da atividade da peroxidase endógena com 3% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) diluído em tampão PBS por 5 minutos. Após este período, os cortes foram lavados em tampão PBS novamente e o bloqueio inespecífico foi realizado com 5% de leite em pó desnatado, diluído em PBS por 30 minutos. Em seguida, o material foi incubado durante toda a noite a 4°C com os anticorpos primários (Tabela 1). Após o período de incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados em PBS por 5 minutos e

incubados dependendo do anticorpo primário, com o anticorpo secundário biotinizado (Tabela 1) por 45 minutos. Em seguida foram lavados novamente com PBS por 5 minutos e a amplificação de sinal foi realizada, incubando-se os cortes com estreptavidina, tiramida e peroxidase conjugada com estreptavidina (*Dako, CSA Amplification system kit – Code: k1500*) por 45 minutos cada um, de acordo com as especificações do fabricante. Após a incubação com estes reagentes, o material foi lavado novamente em PBS (5 minutos), e em seguida a atividade da peroxidase foi visualizada com a solução cromogênica DAB (0,1% de 3,3 – diaminobenzidina (DAB) – *Dako Cytomation LSAB<sub>2</sub><sup>®</sup> System HRP Liquid DAB – Ref. 0673*). Posteriormente, o material revelado foi contra-corado com hematoxilina de *Carazzi* por 2–3 minutos. Por fim, as lâminas foram desidratadas, montadas e analisadas utilizando um sistema de análise computadorizado de imagens (descrito acima).

Para confirmar a especificidade das reações de imuno-histoquímica, os cortes controles foram incubados com o anticorpo primário pré-adsorvidos com excesso de seu respectivo antígeno, nos casos em que o antígeno estivesse disponível. Para evitar os falsos positivos, observado eventualmente nas reações de imuno-histoquímica, algumas lâminas tiveram o anticorpo primário omitido e substituído por PBS, e a omissão do anticorpo secundário também foi realizado. Adicionalmente, para a localização precisa das várias formas dos neurônios de GnRHs e suas respectivas fibras, foram utilizados como base, os seguintes trabalhos: Zandbergen et al. (1995); Dubois et al. (2001); González-Martínez et al. (2001, 2002a, b, 2004) e Pandolfi et al. (2005).

Todas as lâminas histológicas e de imuno-histoquímica de *S. parahybae* foram depositadas na coleção científica do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP).

#### 2.4. Análise de Western blot

Para caracterizar e testar a especificidade dos anticorpos de *C. gariepinus* e de *D. labrax*, no encéfalo e na hipófise de *S. parahybae*, foram realizadas as análises com eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 15% de dodecil-sulfato de sódio (*SDS-PAGE*), seguindo posteriormente com o *Western blot*. Para estas análises, três encéfalos foram manualmente separados das hipófises, congelados separadamente em gelo seco, e posteriormente transferidos para freezer -80°C até o momento do processamento.

As hipófises congeladas foram homogeneizadas com 400 µl de tampão TRIS-HCl (50 mM), pH 7,4 e adicionado 3 µl de uma mistura de inibidor de proteases (*Sigma, St Louis, Mo*), e os encéfalos congelados foram homogeneizados com 1 ml de tampão TRIS-HCl, e

adicionado 5 µl da mesma mistura de inibidor de proteases; todos os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 g a 5 minutos a 4°C e ao sobrenadante também foi adicionada a mistura de inibidor de proteases (3 µl). Posteriormente, para 18 µl deste homogeneizado (para a hipófise) foram adicionados 6 µl de tampão (120 mM TRIS-HCl; pH 6,8; 3% dodecil-sulfato; 10% glicerol; 1% β-mercaptoetanol), e para o homogeneizado de encéfalo (12,5 µl) foram adicionados 3 µl do mesmo tampão. Em seguida, todos os homogeneizados (de hipófise e de encéfalo) foram aquecidos até 95°C por 10 minutos, sendo posteriormente, resfriado em temperatura ambiente. Depois da eletroforese deste homogeneizado (15% SDS-PAGE), as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitro-celulose (*Whatman*<sup>®</sup> *Schleicher & Schuell*), por 1 hora a 4°C à 75 V. Para verificar a total transferência das proteínas para a membrana, foi utilizada a coloração reversível de *Ponceau S*, sendo posteriormente escaneada, além desta ser utilizada como fonte alternativa no controle de carga em *Western blot* (Dittmer & Dittmer, 2006; Aldridge et al., 2008; Romero-Calvo et al., 2010). Adicionalmente, para o marcador molecular (*ColorBrust*<sup>™</sup> *Electrophoresis Marker*, Sigma), foi utilizado 5 µl, para posteriormente, com base neste marcador, serem calculados os pesos moleculares.

Posteriormente, as membranas foram lavadas com TTBS (100 mM TRIS-HCl; 0,9% NaCl; 0,1% Tween-20), pH 7,5, e bloqueado com TTBS contendo 5% de leite em pó desnatado e 3% de BSA (albumina de soro bovino), a 4°C durante toda a noite. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (Tabela 2) por 3 horas em temperatura ambiente. Após este período, três lavagens com TTBS foram realizadas, e as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (especificações descritas na Tabela 2), por uma hora, dependendo do anticorpo primário (Tabela 2), lavado novamente com TTBS, e finalmente incubado (no escuro) com peroxidase conjugada com estreptavidina (*Streptavidin HRP*, DAKO) por 45 minutos. Para a visualização da atividade da peroxidase na membrana de nitrocelulose, as amostras foram visualizadas com a solução cromogênica DAB (*Dako Cytomation*). Finalmente, as membranas foram escaneadas e os seus pesos moleculares foram estimados utilizando-se o programa *Image Gauge software* (Fuji, Japan).

Adicionalmente, como descrito para as reações de imuno-histoquímica, os controles (positivo e negativo), também foram realizados para as análises de *Western blot*.

### 2.5. Análises de dados

Para as análises morfométricas dos neurônios de GnRH durante o ciclo reprodutivo, e após a indução à reprodução em cativeiro, os seguintes parâmetros foram utilizados: densidade óptica da imuno-marcação e área nuclear e celular.

#### 2.5.1. Análise semiquantitativa da densidade óptica

Para as análises de densidade óptica da imuno-marcação para as diferentes formas de GnRH, as imagens de cada amostra capturada pelo sistema LAS (tamanho da imagem: 1260 pixels por 960 pixels) foram analisadas com o auxílio do programa *Image Gauger*, versão 3.12 (análises similares foram descritas em Cánepa et al., 2008; Fiszbein et al., 2010).

Do número total de neurônios-ir em cada encéfalo, oito destes que apresentavam os núcleos nítidos foram selecionados aleatoriamente para a medição da densidade óptica (a.u.). Adicionalmente, para reduzir a variabilidade nos resultados de imuno-histoquímica, as condições destas reações foram controladas e mantidas homogêneas em todos os parâmetros. Além disso, devido ao fato de ser difícil comparar a intensidade de imuno-marcação entre as amostras processadas separadamente, representantes de cada estágio de maturação gonadal e após a indução à reprodução em cativeiro foram incluídas em cada lote de reação de imuno-histoquímica para controlar estas possíveis diferenças de imuno-marcação.

#### 2.5.2. Análise semiquantitativa da área nuclear e celular

As mesmas imagens utilizadas nas análises da densidade óptica foram utilizadas para as medições da área nuclear e celular dos diferentes neurônios de GnRH-ir. Para estas análises, oito neurônios de cada animal foram aleatoriamente selecionados e analisados utilizando-se o programa *Image-Pro<sup>®</sup> Plus – The Proven Solution* (versão, 4.5.0.29). Adicionalmente, nestas análises, assim como na densidade óptica, foram incluídos apenas os neurônios-ir que apresentavam os núcleos claramente visíveis. Estas análises foram previamente descritas por Pandolfi et al. (2005); Cánepa et al. (2006; 2008) e Fiszbein et al. (2010).

### 2.6. 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 o estágio de maturação gonadal (pré-vitelogênico, vitelogênico ou regressão) e após a indução à reprodução (grupo reprodução). As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando-se a análise de variância (one-way ANOVA), seguido pelo teste *Student-Newman-Keuls* (SNK)



para análises paramétricas ou o teste *Dunn's* ou *Tukey* para as análises não-paramétricas. Em todas as análises, diferenças significativas foram consideradas quando  $P < 0,05$  (Zar, 2010). Estas análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico *SigmaStat* para *Windows* (versão, 3.10, *Copyright*).

### 3. Resultados

Todos os peixes utilizados no presente estudos eram fêmeas adultas, sendo amostrados 28 animais no estágio pré-vitelogênico, 22 animais no estágio vitelogênico, 18 animais no estágio regressão e 6 animais induzidos a reprodução. Os dados biométricos e ponderais destes animais, analisadas por estágio de maturação gonadal, não apresentaram diferenças significativas (Tabela 3). Por outro lado, os valores de IGS se alteraram significativamente em *S. parahybae* durante o ciclo reprodutivo, *i.e.*, observa-se um aumento significativo dos valores de IGS quando as fêmeas passaram do estágio pré-vitelogênico para o vitelogênico e aptas para a reprodução. Estes valores retornaram aos iniciais no estágio regressão ( $P < 0,01$ ) (Tabela 3).

#### 3.1. Análises histológicas, imuno-histoquímicas e Western blot

Na figura 1a encontra-se a posição anatômica do encéfalo na cabeça de uma fêmea adulta de *S. parahybae*. Analisando o encéfalo de uma vista dorsal (Fig.1b), podemos identificar dois pares de lóbulos (um mais anterior e outro mais mediano) e um lóbulo ímpar. Os lóbulos mais anteriores são os chamados hemisférios telencefálicos (Tel), dos quais partem o trato olfatório médio (TOM). Os lóbulos mais medianos correspondem ao tecto óptico (TO), e o último lóbulo, ímpar, bem desenvolvido em *S. parahybae*, é o cerebelo (Ce). Ainda macroscopicamente, da extremidade do Tel (região mais anterior do encéfalo), em direção a cavidade nasal, partem dois prolongamentos finos, o TOM (Figs. 1b, c). Na extremidade desta estrutura mais anteriormente ao Tel, encontram-se uma porção mais dilatada, os chamados, bulbos olfatórios, que em *S. parahybae*, localiza-se bem próximo a cavidade nasal (Fig. 1c). Por outro lado, de uma vista ventral ântero-posterior (Fig. 1d), podemos distinguir o quiasma óptico (OC), o Tel, a hipófise, os lóbulos inferiores (IL) e entre eles o saco vasculoso (SV), e a medula (MO).

A figura 2 apresenta um esquema da visão lateral do encéfalo de *S. parahybae* e as linhas pontilhadas indicam os níveis das regiões dos cortes transversais ilustrados na figura 3. Microscopicamente, o Tel pode ser dividido em duas principais áreas, dorsal (Dd) e ventral (Vl) (Fig. 3a), sendo que, os principais núcleos identificados nestas áreas foram: núcleo dorsal

(Dd e Vd), central (Dc1 e Dc2), lateral (Dld), medial (Dm2 e Dm3) e ventral (Vv e Dlv). Além disso, podemos identificar histologicamente os dois prolongamentos (TOM) que partem do Tel em direção a cavidade nasal (Fig. 3a).

No diencéfalo (Figs. 3b, c, d, e, f) de *S. parahybae*, foram identificados as principais estruturas desta região, como por exemplo, a área pré-óptica (POA), nervo olfatório (NO), OC, TO, IL, e o terceiro ventrículo (V). A POA rodeia o recesso pré-óptico (POR) do terceiro ventrículo (Fig. 3b). Os principais núcleos da POA são os núcleos periventricular (NPP) (Fig. 3c) e anterior periventricular (NAP) (Fig. 3e), sendo um dos mais importantes no processo reprodutivo de *S. parahybae*. Estes núcleos localizam-se mais ventralmente a comissura anterior (AC) e a comissura horizontal (HC) (respectivamente, Figs. 3b e 3d). Outra região de extrema relevância no presente estudo é o hipotálamo médio basal (HBM) (Fig. 3f), localizado ventralmente na POA, entretanto, mais caudalmente (região posterior) que os núcleos NPP e NAP. Além disso, o HBM localiza-se em uma região mais central, e nas porções laterais visualizamos o IL (Fig. 3f). Do HBM também se projeta o pedúnculo hipofisário (PS) (Fig. 3g), e na sua outra extremidade encontra-se a hipófise (Pi) (Fig. 3g). Ainda próximo ao HBM, dorsalmente pode-se identificar o cérebro médio (MB) e a válvula do cerebelo (Vce), além de se localizar próximo ao terceiro ventrículo (Fig. 3h). O MB é outra região de importância para o presente estudo. Posteriormente ao HBM e a Pi, situa-se o núcleo do saco vasculoso (NSV) (Fig. 3i) e o saco vasculoso (SV) (Figs. 3j, k). O quarto ventrículo (IV), a camada molecular do cerebelo (M) e a camada granular do cerebelo (G) localizam-se respectivamente ao final e posteriormente ao SV (Figs. 3k, l). Por fim, as regiões encefálicas de interesse no presente estudo são o telencéfalo ventral (NPP e NAP), a região hipotalâmica (HBM), a hipófise (Pi) e o cérebro médio (MB), regiões estas, que localizam-se os neurônios produtores de GnRH.

No presente estudo, foram utilizados sete diferentes anticorpos para localizar e identificar as diferentes formas moleculares de GnRHs no encéfalo e na hipófise de *S. parahybae*, cfGnRH (*catfish* GnRH), cGnRH-II (*chicken* GnRH-II), sGnRH (*salmon* GnRH), cfGAP (*catfish* GAP), cGAP (*chicken* GAP-II), sGAP (*salmon* GAP) e LRH<sub>13</sub>. Entretanto, apenas cinco anticorpos apresentaram imuno-reatividade (ir). Devido a co-localização de cfGnRH-cfGAP-ir (Figs. 4a, b, c, d) e cGnRH-II-cGAP-II-ir (Figs. 4e, f, g, h), nós preferimos utilizar o anticorpo GAP como alternativa ao anticorpo GnRH, o que será discutido posteriormente. Adicionalmente, o anticorpo LRH<sub>13</sub> (monoclonal) apresentou neurônios-ir apenas na região ventral do encéfalo (Figs. 4i, j) de *S. parahybae*, não apresentando imuno-reatividade na região do MB (dados não apresentados). Além disso, não foi observado

nenhum neurônios-ir e/ou fibras no encéfalo de *S. parahybae* quando utilizamos os anticorpos sGnRH e/ou sGAP (dados não apresentados). Do mesmo modo, não foi observado imunomarcação positiva quando o anticorpo foi pré-adsorvido com os seus respectivos antígenos, ou quando o anticorpo primário ou o anticorpo biotinilado foi omitido.

Os neurônios-ir de *S. parahybae* com cfGAP foram identificados por toda região ventral do Tel e em diversas áreas do diencéfalo, ou seja, principalmente na POA (Fig. 5a), nos núcleos NPP, NAP (respectivamente, Figs. 5b, c), e no HBM (Figs. 4c, d). Ainda em relação a caracterização dos neurônios-ir com cfGAP, escassos e pequenos neurônios-ir na região ventral anterior do Tel (incluindo alguns na POA, NPP e NAP) foram identificados (diâmetro médio:  $16,54 \pm 0,32 \mu\text{m}$ ) (Fig. 5d), aumentando significativamente ( $P < 0,01$ ) de tamanho conforme se distribuem da região anterior para região posterior (rostro-caudal), ou seja, especialmente nas regiões do NPP e HMB (diâmetro médio:  $25,11 \pm 0,58 \mu\text{m}$ ) (Fig. 5e) (Tabela 4). Na região do MB, foram identificados os neurônios-ir que sintetizam e liberam o cGAP-II ( $24,02 \pm 0,42 \mu\text{m}$ ), próximo ao terceiro ventrículo (Figs. 4g, h) (Tabela 4). Adicionalmente, neurônios-ir com o anticorpo cGnRH-II também foram identificados ventralmente na região do telencéfalo ventral (Fig. 5f), apresentando a mesma distribuição dos neurônios para cfGAP. Entretanto, ao utilizar o anticorpo para cGAP-II, estes neurônios-ir na região ventral, não apresentaram reações positivas (dados não apresentados).

Fibras-ir com cfGAP foram observadas praticamente em todas as regiões do encéfalo de *S. parahybae*, i.e., TOM, POA, NO, OC, NPP, NAP, HBM e TO (Fig. 6). Adicionalmente, na região HBM de *S. parahybae*, fibras-ir fortemente marcadas (Fig. 7a) foram observadas em direção a Pi (Fig. 7b) com cfGAP, principalmente na região do PS e na Pi (Fig. 7c), especialmente na região da proximal pars distalis (PPD) (Fig. 7d). Fibras-ir com cGAP-II próximos ao terceiro ventrículo e no TO também foram identificadas (respectivamente, Figs. 7e, f). Além disso, não foi observado nenhuma fibra-ir com cGAP-II no PS e na Pi de *S. parahybae*. Adicionalmente, fibras-ir foram identificadas no Órgão Subcomissural (Órgão circunventricular) (Fig. 8a), localizada no topo do terceiro ventrículo, imediatamente atrás do gânglio habenular. Estas fibras-ir foram observadas com cfGAP (Fig. 8b), com cGAP-II (Fig. 8c) e nenhuma marca no controle negativo (Fig. 8c).

Com base nestes resultados descritos, o padrão de distribuição dos diferentes neurônios-ir para os diferentes peptídeos associados aos GnRHs, baseados nas reações de imuno-histoquímicas, estão sumarizados na figura 9.

Por fim, a figura 10, sumariza os resultados obtidos pelo *Western blot* para testar a especificidade dos anticorpos cfGAP e cGAP-II no encéfalo e na hipófise de *S. parahybae*.

Esta especificidade pode ser inferida na ausência de imuno-reatividade quando os anticorpos primários são incubados com o excesso de antígenos, método este, que também pode ser inferido nas análises de imuno-histoquímica (dados não apresentados). Finalmente, esta análise, reconheceu uma específica banda para cfGAP na hipófise e o peso molecular estimado foi de 9KDa. Entretanto, no encéfalo, devido à presença de muitas proteínas e consequentemente muitas bandas inespecíficas, adicionado ao baixo peso molecular do cfGAP, foi difícil de caracterizar esta forma de GnRH por este método, o que será posteriormente discutido. Em relação ao cGAP-II, apenas no encéfalo foi identificada uma banda específica pela análise de *SDS-PAGE* e o peso molecular estimado foi de 26KDa.

### 3.2. Análise semiquantitativa de densidade óptica e área celular e nuclear

Devido a maior quantidade de neurônios-ir com o anticorpo cfGAP na região do HBM, apenas estes neurônios-ir foram considerados para estas análises durante o ciclo reprodutivo, e que será discutido posteriormente. Em relação à densidade óptica de cfGAP, diferenças significativas entre os estádios do ciclo reprodutivo e após a indução artificial à reprodução foram identificadas. A densidade óptica aumentou do estágio pré-vitelogênico ( $124,86 \pm 2,06$  a.u.) para o estágio vitelogênico ( $163,32 \pm 3,13$  a.u.) ( $P < 0,01$ ) e continuou elevada no estágio regressão ( $156,12 \pm 4,32$  a.u.) se comparado ao estágio pré-vitelogênico ( $P < 0,01$ ) (Fig. 11a). No grupo reprodução, estes valores ( $118,80 \pm 2,91$  a.u.) diminuíram significativamente, em relação aos estádios vitelogênico e regressão ( $P < 0,01$ ), alcançando valores próximos ao estágio pré-vitelogênico (Fig. 11a). Por outro lado, o cGAP-II apresentou pouca variação, sendo maior no estágio regressão ( $181,62 \pm 2,50$  a.u.), se comparados com os estádios pré-vitelogênico ( $158,89 \pm 3,31$  a.u.), vitelogênico ( $165,76 \pm 2,75$  a.u.) e reprodução ( $167,04 \pm 4,82$  a.u.) ( $P < 0,01$ ) (Fig. 11b).

O diâmetro celular e nuclear médio dos neurônios-ir com cfGAP não apresentou diferenças estatísticas durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae* (respectivamente: pré-vitelogênico:  $25,30 \pm 0,99$   $\mu\text{m}$  e  $11,62 \pm 1,15$   $\mu\text{m}$ ; vitelogênico:  $26,04 \pm 1,53$   $\mu\text{m}$  e  $14,43 \pm 1,33$   $\mu\text{m}$ ; regressão:  $23,44 \pm 1,20$   $\mu\text{m}$  e  $11,41 \pm 0,95$   $\mu\text{m}$ ; reprodução:  $24,90 \pm 5,65$   $\mu\text{m}$  e  $11,98 \pm 0,58$   $\mu\text{m}$ ) (Tabela 5). Assim como, para os neurônios-ir cGAP-II (respectivamente: pré-vitelogênico:  $24,53 \pm 0,99$   $\mu\text{m}$  e  $9,84 \pm 0,23$   $\mu\text{m}$ ; vitelogênico:  $22,66 \pm 0,84$   $\mu\text{m}$  e  $9,60 \pm 0,53$   $\mu\text{m}$ ; regressão:  $23,73 \pm 0,66$   $\mu\text{m}$  e  $10,63 \pm 1,51$   $\mu\text{m}$ ; reprodução:  $25,77 \pm 0,88$   $\mu\text{m}$  e  $9,24 \pm 0,58$   $\mu\text{m}$ ) (Tabela 5).

#### 4. Discussão

Neste estudo, nós apresentamos a distribuição de neurônios-ir em diferentes áreas encefálicas de *S. parahybae*, utilizando específicos anticorpos para GnRH e GAP. Devido a co-localização de cfGnRH-cfGAP e cGnRH-II-cGAP-II em *S. parahybae*, nós optamos pelo anticorpo GAP como alternativa ao anticorpo GnRH, uma vez que, ao clonar completamente os diferentes cDNAs que codificam as diferentes formas moleculares de GnRH, proporcionam informações precisas sobre a estrutura molecular, além de fornecerem outras informações, pois, estas sequências codificam o próprio GnRH, um peptídeo sinal, um outro peptídeo de processamento e os peptídeos associados ao GnRH (GAPs) (González-Martínez et al., 2002a; Guilgur et al., 2007). Este último consiste em oligopeptídeos e mais divergentes, ou seja, com uma menor homologia entre os diferentes GAPs se comparado aos diferentes GnRHs (González-Martínez et al., 2002a; Guilgur et al., 2007). Estas características moleculares dos diferentes GAPs conferem uma maior especificidade se comparado com os diferentes GnRHs, sugerindo que os GAPs são ferramentas valiosas na identificação dos diferentes tipos de GnRH, já que, evitam as reações cruzadas associado ao uso de apenas anticorpos contra GnRH. Estas reações cruzadas são frequentemente observadas nas reações de imuno-histoquímica (Zandbergen et al., 1995; Dubois et al., 2001; González-Martínez et al., 2001, 2002a; Pandolfi et al., 2005), e também foi observado no presente estudo entre os anticorpos cfGnRH-cGnRH-II e não ocorreu quando utilizamos os diferentes GAPs.

A análise por 15% *SDS-PAGE* seguido pelo *Western blot* reconheceu uma específica banda para cfGAP na hipófise de *S. parahybae* (9KDa). Entretanto, no encéfalo do surubim, não foi possível identificar claramente esta banda, provavelmente, devido a presença de muitas proteínas, o que resultava em muitas bandas inespecíficas. Além disso, o baixo peso molecular desta molécula dificultou a caracterização do cfGAP no encéfalo de *S. parahybae*. Já na hipófise, por ser um órgão menor e conter uma quantidade menor de proteínas (se comparada ao encéfalo), o resultado do *SDS-PAGE* era mais “limpo”, ou seja, sem muitas bandas inespecíficas. Para as espécies de bagres, não foram realizados estudos com este método e, portanto, não temos na literatura dados para a comparação do peso molecular encontrado no presente estudo. Adicionalmente, para *Cichlasoma dimerus* (Pandolfi et al., 2005), o peso molecular de sGAP e sbGAP (este último é específico na liberação de gonadotropinas nesta espécie) foram de 7,5KDa, 1,5KDa menor se comparado ao resultado obtido para *S. parahybae* (cfGAP, específico na liberação de GtHs nesta espécie). Esta diferença ocorre provavelmente devido a distância filogenética de *C. dimerus* em relação a *S. parahybae* (respectivamente, Perciformes para Siluriformes) (Nelson, 2006).

O peso molecular de cGAP-II, identificado em *S. parahybae*, pela análise de SDS-PAGE (26KDa), foi superior ao esperado para cGAP-II, pois sugere-se que o peso molecular seja de aproximadamente 7KDa (baseado na sequência de aminoácidos de cGnRH-II em outras espécies) (González-Martínez et al., 2002a). A especificidade do anticorpo utilizado neste estudo não apresenta dúvidas, pois a ausência de imuno-reatividade nas reações de imuno-histoquímica e *Western blot* quando incubados com o anticorpo cGAP-II de *D. labrax* com o excesso de antígeno de cGAP-II (teste de pré-adsorção) do próprio *D. labrax*, reforçam a especificidade do anticorpo para as reações utilizadas em *S. parahybae*. Esta diferença observada no valor aproximado do peso molecular de cGAP-II utilizando o anticorpo de *D. labrax* em *S. parahybae* também foram identificadas em outras espécies, *i.e.*, *C. dimerus* (Pandolfi et al., 2005).

No presente estudo, nós localizamos por imuno-histoquímica, os sítios de expressão de duas diferentes formas de GnRH que estão presentes em áreas encefálicas específicas de *S. parahybae*. Apesar de ter sido utilizado três diferentes tipos de GnRH (cfGAP, cGAP-II e sGAP), apenas duas formas de GnRH foram identificadas no encéfalo de *S. parahybae*: os neurônios-ir com cfGAP distribuídos em toda a região ventral do Tel e nas principais áreas do diencéfalo e os neurônios-ir com cGAP-II no MB. Adicionalmente, o anticorpo LRH<sub>13</sub> foi sintetizado contra a região conservada comum dos conhecidos GnRHs, portanto, é capaz de reconhecer provavelmente todas as diferentes formas de GnRHs presente em uma espécie. O anticorpo LRH<sub>13</sub> reconhece a região por volta da serina e da tirosina das conhecidas formas de GnRHs, entretanto, apresenta baixa afinidade com o cGnRH-II, pois, nesta forma de GnRH a tirosina é substituída por histidina (Park & Wakabayashi, 1986). Este anticorpo, segundo alguns trabalhos, não apresenta afinidade com cGnRH-II, como identificado em *Odontesthes bonariensis* (Stefano et al., 2000) e *Colisa laila* (Oka, 1997). Entretanto, Miranda et al. (2003), apresentam neurônios-ir com LRH<sub>13</sub> em *O. bonariensis* na região do MB, provavelmente, a diferença de marcação e não marcação com LRH<sub>13</sub> em uma mesma espécie, foi devido ao protocolo de imuno-histoquímica aplicada pelos diferentes autores. Ainda neste sentido, Pandolfi et al. (2002), apresentam marcação positiva com LRH<sub>13</sub> na região do MB em *C. dimerus*, e o mesmo anticorpo não reconheceu os neurônios ventrais para sGnRH. Em *S. parahybae*, ao utilizar o LRH<sub>13</sub>, neurônios-ir foram identificados apenas na região ventral do Tel e nas principais áreas do diencéfalo e não foi observada reação positiva na região do MB. Estes dados também corroboram a hipótese de que *S. parahybae* apresenta apenas duas formas de GnRHs no encéfalo.

Adicionalmente, a identificação e distribuição dos neurônios-ir com cfGAP na região ventral do Tel e nas principais áreas do diencéfalo (NPP, NAP e HMB), no PS, na Pi (região da PPD), e neurônios-ir com cGAP-II restritos ao tegumento do MB, próximo ao terceiro ventrículo em *S. parahybae*, estão de acordo com as distribuições e identificações dos neurônios de GnRH e GAP previamente descritos para outras espécies de Siluriformes, o *catfish* africano (*C. gariepinus*) (Bogerd et al., 1992, 1994; Schulz et al., 1993; Zandbergen et al., 1995; Goos et al., 1997; Dubois et al., 2001) e o *thai catfish* (*C. macrocephalus*) (Ngamvongchon et al., 1992). Em outra espécie de Siluriformes, *C. batrachus* (Subhedar & Rama-Krishna, 1988) foram observados neurônios-ir para mGnRH (*mammalian* GnRH) nas mesmas áreas ventrais do Tel e nas áreas principais do diencéfalo encontradas para o cfGnRH no *S. parahybae*, e que Zandbergen et al. (1995) também identificaram para *C. gariepinus*. Além disso, estes últimos autores comentam que em extratos encefálicos desta espécie não identificaram a presença de mGnRH utilizando a técnica de HPLC, portanto, provavelmente esta reação positiva com mGnRH é decorrente de uma reação cruzada (Zandbergen et al., 1995). No presente estudo, utilizamos também o anticorpo LRH<sub>13</sub>, que de acordo com os autores Park & Wakabayashi (1986) que produziram este anticorpo, o mesmo, seria adequado no reconhecimento de mGnRH, entretanto, a mesma distribuição de LHR<sub>13</sub> e cfGnRH nos mesmos neurônios-ir foram demonstradas neste estudo, pois, cortes adjacentes foram incubados com anticorpo para LRH<sub>13</sub> e em outro com cfGnRH, e foram observados neurônios-ir com ambos anticorpos, indicando a presença de cfGnRH na região ventral do Tele nas principais áreas do diencéfalo deste bagre. Estes resultados adicionados ao já descrito na literatura, sugere que provavelmente, todos os teleósteos chamados de bagres (*catfish*, Siluriformes), apresentam apenas duas formas diferentes de GnRH (cfGnRH e cGnRH-II).

Em outras regiões do encéfalo de *S. parahybae* foram observadas fibras com marcação positiva com o anticorpo para cfGAP, como por exemplo, no TO, Ce, IL, OC, NO, TOM. As funções das projeções de fibras para outras regiões do encéfalo ainda permanecem incertas, sendo necessários outros estudos específicos para identificar as possíveis funções do GnRH, além da estimulação das GtHs. Identificações de projeções de GnRH em outras regiões encefálicas em outras espécies de teleósteos, também foram observadas, como por exemplo, em *C. dimerus*, *C. gariepinus*, *D. labrax*, *O. bonariensis*, entre outros (Zandbergen et al., 1995; Dubois et al., 2001; González-Martínez et al., 2001, 2002a; Pandolfi et al., 2005). Adicionalmente, o órgão sub-comissural (órgão circunventricular) que é uma glândula altamente especializada, apresentou fibras-ir fortemente para GnRH (cfGnRH e cGnRH-II).

Finos prolongamentos se agrupam e formam o chamado “Fibras de *Reissner's*” (Saha et al., 2000; Saha & Subhedar, 2011), e alguns estudos apontam que os produtos sintetizados por este órgão (majoritariamente glicoproteínas), são liberados no terceiro ventrículo (Saha & Subhedar, 2011). No entanto, a precisa natureza desta secreção, mecanismo de regulação ou função deste órgão ainda permanece incerto. No presente estudo, não sabemos o papel fisiológico da presença de fibras-ir com GnRH neste órgão.

A segunda forma de GnRH observada em *S. parahybae* foi o cGnRH-II, distribuídos na região do tegumento do cérebro médio, próximo ao terceiro ventrículo, eventualmente associado a vasos sanguíneos e apresentou o mesmo padrão de distribuição em outros teleósteos (Dubois et al., 2002; Somoza et al., 2002a; Gorbman & Sower, 2003; Guilgur et al., 2006; Zohar et al., 2010). Neurônios-ir com o anticorpo cGnRH-II na região do NPP e HBM observado no presente estudo, sugerem a mesma distribuição dos neurônios-ir com o anticorpo cfGAP, e que foi decorrente de uma reação cruzada entre o anticorpo cGnRH-II com os neurônios cfGnRH, pois com o anticorpo cGAP-II, não foram observadas reações positivas nestes neurônios da região rostro-caudal do eixo do telencéfalo e hipotálamo. Reações cruzadas observadas em *S. parahybae* também foram observadas nos primeiros estudos com *C. gariiepinus* (Zandbergen et al., 1995) e em outras espécies de teleósteos (González-Martínez et al., 2002a; Pandolfi et al., 2005), quando utilizamos apenas o anticorpo para GnRH. Desta forma, como mencionado anteriormente, alguns estudos apresentam que esses diferentes GAPs são ferramentas valiosas para a localização específica das células que expressam as diferentes formas de GnRH, porque tem sido registrado que essas diferentes formas de GnRH são consistentemente idênticas com os seus respectivos GAPs (Dubois et al., 2001; González-Martínez et al., 2001, 2002a, 2004; Pandolfi et al., 2005), até mesmo, quando utilizamos anticorpos em espécies próximas e/ou distantes filogeneticamente, o que pode ser observado também no presente estudo, pois utilizamos os anticorpos de *C. gariiepinus* cfGAP e *D. labrax* cGAP-II no encéfalo e na hipófise de *S. parahybae*.

Apesar da presença de neurônios de cGnRH-II ter sido reportada em todas as classes de vertebrados, exceto em lampréias (Bennis et al., 1989; van Gils et al., 1993; Lescheid et al., 1997; Urbanski et al., 1999; Sherwood & Adams, 2005), a primeira espécie em que foi registrada a presença de neurônios que expressam cGnRH-II, foi em *Xiphophorus maculatus* (Münz et al., 1981), e posteriormente em *Carassius auratus* (Kah et al., 1986). Embora tenha sido identificado há muito tempo atrás, a função específica desta forma de GnRH ainda permanece incerta. Por outro lado, recentemente, Servilli et al. (2010), demonstraram que a glândula pineal de *D. labrax* expressa fortemente receptores de cGnRH-II, e fornecem pela



primeira vez, em uma espécie de vertebrado, evidências que suportam o papel de cGnRH-II na modulação das funções desta glândula fotorreceptora, principalmente na secreção noturna de melatonina. Por outro lado, em várias espécies de teleósteos, é sugerido que o cGnRH-II em áreas extra-hipotalâmicas agem como neurotransmissores ou neuromoduladores, principalmente em relação ao comportamento reprodutivo (Anglade et al., 1993; Amano et al., 2002; Miranda et al., 2003; Pandolfi et al., 2005). Estudos neste contexto estão sendo iniciados em nosso laboratório com *S. parahybae*.

Em *S. parahybae*, a ausência de uma direta conexão dos neurônios de cGAP-II no MB com a hipófise, através do pedúnculo hipofisário (confirmado pelas análises de imunohistoquímica e *Western blot*), indicam que esta forma de GnRH não está relacionada diretamente com a liberação de GtHs nesta espécie. Em *C. auratus* sGnRH e cGnRH-II são encontradas em diferentes áreas do encéfalo e na hipófise (Yu et al., 1987, 1988), e ambos GnRHs são eficientes na estimulação e liberação de GtHs nesta espécie. No salmonídeo *Oncorhynchus masou*, que também apresenta apenas duas formas de GnRHs, foi identificada a forma sGnRH em diferentes áreas do encéfalo e na hipófise, no entanto, diferentemente de *C. auratus*, cGnRH-II não foi identificado na hipófise e não apresentou atividade na liberação de GtHs (Amano et al., 1991). Do mesmo modo, em *C. gariepinus*, espécie que também apresenta apenas duas formas de GnRH, cfGnRH e cGnRH-II, apenas a forma cfGnRH é efetiva na modulação de GtHs (Zandbergen et al., 1995). Em *C. dimerus* e *D. labrax* (espécies que apresentam 3 formas de GnRHs), o sGnRH e o sbGnRH (*seabream* GnRH) estão distribuídos em diferentes áreas encefálicas e inervam a hipófise, e provavelmente apenas a forma sbGnRH é a mais efetiva na estimulação de GtHs, e a outra forma, cGnRH-II, presente apenas no encéfalo, não apresenta atividade nesta estimulação (González-Martínez et al., 2002a; Pandolfi et al., 2005). No entanto, em *Verasper moseri*, espécie que também apresentam sGnRH, sbGnRH e cGnRH-II em diferentes áreas do encéfalo, apenas o sbGnRH inerva a glândula hipofisária, indicando que apenas esta forma de GnRH é responsável no controle neural da reprodução desta espécie (Amano et al., 2002). Adicionalmente, em *Sparus aurata*, foram identificadas três formas de GnRH (sGnRH, sbGnRH e cGnRH-II) (Holland et al., 1998), e nesta espécie, sbGnRH e cGnRH-II foram observados na hipófise, no entanto, os autores sugerem que a forma mais efetiva é o sbGnRH.

Com estes resultados, a imuno-marcação positiva com o anticorpo cfGAP nos neurônios e numerosas fibras-ir na região ventral do Tel e nas principais áreas do diencéfalo, na hipófise e no pedúnculo hipofisário, e a não reação positiva com cGAP-II no pedúnculo e na hipófise de *S. parahybae*, adicionado com a identificação de cfGAP nas análises de SDS-

*PAGE* na hipófise, e a não identificação de cGAP-II nos extratos hipofisários (com o método de *SDS-PAGE*), demonstram claramente que nesta espécie o sistema cfGnRH de origem da região ventral do Tel e das principais áreas do diencéfalo está relacionado com o controle endócrino do eixo hipotálamo-hipófise, fortalecendo ainda, o conceito de que o cfGnRH é o principal neuropeptídeo que controla a síntese e liberação de GtHs (FSH e LH) em bagres. Conclusões similares ao presente estudo foram encontradas para outras espécies de teleósteos, como por exemplo, para *Anguilla anguilla* (Montero et al., 1994); para *D. labrax* (González-Martínez et al., 2004), para *C. dimerus* (Pandolfi et al., 2005), para *O. bonariensis* (Montaner et al., 2001), entre outros, nos quais, a forma de GnRH distribuída na região ventral do encéfalo, está relacionada diretamente com a liberação de FSH e LH.

No que diz respeito à evolução das diferentes formas de GnRHs, apesar das espécies popularmente conhecidas como “bagres” e “salmões” apresentarem apenas duas diferentes formas de GnRH, se comparado com outras espécies de teleósteos mais derivadas que apresentam três diferentes formas (ver revisões: Somoza et al., 2002a; Gorbman & Sower, 2003; González-Martínez et al., 2004; Lethimonier et al., 2004; Sherwood & Adams, 2005; Guilgur et al., 2006; Kah et al., 2007; Okubo & Nagahama, 2008; Zohar et al., 2010), a identificação de três diferentes formas de GnRH na espécie de peixe considerado mais basal, como o *herring* (*Clupea harengus*) (Carolsfeld et al., 2000), indicam que a presença de três formas de GnRH, não é restrito as espécies consideradas mais derivadas, reativando a questão à respeito da presença de diferentes formas moleculares de GnRH (duas ou três?) em uma única espécie. Além do mais, González-Martínez et al. (2002a), como apresentado anteriormente, em encéfalos de *D. labrax* apresentam 3 diferentes formas de GnRH, o sGAP e sbGAP (distribuídos na região ventral do encéfalo e na hipófise) e o cGAP-II (distribuídos na região do MB). Nesta espécie, numerosos e grandes neurônios-ir com sGAP na região anterior do Tel e no bulbo olfatório foram identificados, e nesta mesma região, pequenos neurônios-ir com sbGAP também foram observados, diferentemente dos maiores e numerosos neurônios-ir da região hipotalâmica (sbGAP, forma efetiva na liberação de gonadotropinas). Com estes resultados, adicionado ao fato, de que em bagres, pequenos e escassos neurônios-ir estão presentes na área olfatória, González-Martínez et al. (2002a) sugerem que a terceira forma nas espécies que apresentam duas diferentes formas (*bagres* e *salmonídeos*), provavelmente ainda não foram descobertas. Entretanto, os dados moleculares (Bogerd et al., 1992, 1994; Schulz et al., 1993; Goos et al., 1997) em outras espécies de bagres, não indicam a presença de qualquer outra forma de GnRH nestas espécies, sugerindo que a presença de duas ou três formas de GnRH em uma única espécie, provavelmente é resultado de uma duplicação gênica ocorrida

durante o início da evolução dos teleósteos (Dubois et al., 2002; Venkatesh, 2003). Adicionalmente, a maioria das espécies de teleósteos nas quais foi identificada a terceira forma, apresentaram o sGAP na região anterior do telencéfalo (Zohar et al., 2010), o que não foi identificado no presente estudo, pois em encéfalos de *S. parahybae* não foram observados neurônios-ir ou alguma banda específica quando incubados com sGAP (respectivamente com imuno-histoquímica e *Western blot*). Aliás, o anticorpo contra cfGAP é muito específico e os diferentes GAPs de bagres e salmão, são dissimilares (Dubois et al., 2001).

Ainda neste sentido, Dubois et al. (2001), apresentam que o bagre africano apresenta 3 distintas populações de GnRH, sendo uma população restrita ao MB (cGnRH-II), e outras duas populações de cfGnRH, sendo uma população mais anterior distribuída no nervo terminal (TN) que não inervam a hipófise, e outra população de neurônios distribuídas no ventralmente no Tel e nas principais áreas do diencéfalo, e que inervam a hipófise através do pedúnculo hipofisário. Estes resultados foram baseados nas diferenças morfológicas, no tempo de surgimento destes neurônios de GnRH durante o desenvolvimento ontogenético do *catfish* africano, e na ausência de conexão com a glândula hipofisária com o método *Dil tracing* (*1-1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin perchlorate*) (Dubois et al., 2001). Esta diferença morfológica entre os neurônios de GnRH em *S. parahybae* também foi identificada, uma vez que, escassos e pequenos neurônios-ir dispersos na região anterior, ao contrário dos maiores e numerosos neurônios-ir na região posterior (principalmente no HBM) foram observados. Além disso, o anticorpo contra cfGAP marcou fortemente as fibras no Tel ventral e nas principais áreas do diencéfalo, no pedúnculo hipofisário, e na hipófise, provavelmente, esta inervação se originou de neurônios-ir de cfGnRH desta região do HBM e não dos neurônios do TN. No entanto, a diferente origem e/ou migração dos neurônios de GnRH durante a ontogênese, e a precisa inervação da hipófise pelos neurônios localizados mais anteriormente no TN no surubim do Paraíba ainda precisam ser estudadas.

No presente estudo, *S. parahybae* apresentou grandes neurônios-ir para cGAP-II, assim como, os neurônios efetivos na liberação de GtHs (cfGAP), diferentemente dos neurônios-ir da região anterior (menores). Esta variação do diâmetro celular de GnRH em outras espécies de peixes teleósteos também foram observadas, ou seja, em *D. labrax*, sGAP, sbGAP e cGAP-II apresentaram respectivamente: 10-25  $\mu\text{m}$ , 5-20  $\mu\text{m}$  e 15-23  $\mu\text{m}$  (González-Martínez et al., 2002a); em *C. dimerus*, apresentou 5-20  $\mu\text{m}$  (sGAP), 4-17  $\mu\text{m}$  (sbGAP) e 21  $\mu\text{m}$  (cGAP-II) (Pandolfi et al., 2005); e em *C. gariepinus*, cfGAP apresentou 7  $\mu\text{m}$  (em neurônios anteriores) e 16  $\mu\text{m}$  de comprimento e 8  $\mu\text{m}$  de altura, nos neurônios posteriores, e 25-40  $\mu\text{m}$  para cGAP-II (Dubois et al., 2001). No entanto, esta variação do diâmetro celular

pode ser explicada também com base nas diferenças do tamanho corpóreo do animal (Grober et al., 1994), e não pela diferentes espécies consideradas/comparadas. Além do mais, Grober et al. (1994), sugerem que as alterações de diâmetro dos neurônios de GnRH podem estar envolvidas com o processo de maturação gonadal (mudanças podem estar relacionadas com os estágios finais de maturação sexual) e/ou transição entre as fases do ciclo de vida (juvenil para adulto), e que alguns desses eventos podem ser regulados também pelos esteróides gonadais, sugerindo também uma análise destes hormônios. Levando em consideração estes resultados supracitados, utilizamos no presente estudo, animais sexualmente adultos que não apresentaram diferenças no tamanho corpóreo, assim a manutenção do diâmetro celular em *S. parahybae* durante o ciclo reprodutivo (para cfGAP e cGAP-II), indica um complexo funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Portanto, estes resultados precisam ser analisados com cautela.

Por outro lado, a variação da densidade óptica durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae* em cativeiro, sugere que o cfGnRH durante o estágio pré-vitelogênico foi sintetizado e liberado de forma suficiente para preparar os oócitos durante a vitelogênese, nos quais, o cfGnRH modula a liberação de FSH, que por sua vez, estimula a produção de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) pelos ovários e liberação na corrente sanguínea, promovendo assim, a síntese de vitelogenina pelo fígado, e posteriormente, na incorporação da mesma pelos oócitos, resultando na completa maturação gonadal, mesmo em animais em condições de cativeiro. As análises histológicas dos ovários e o perfil do  $E_2$  plasmático durante o ciclo reprodutivo corroboram esta hipótese, pois, o surubim do Paraíba em cativeiro apresenta oócitos completamente vitelogênicos durante o período reprodutivo (por volta de novembro-fevereiro), e durante a fase pré-vitelogênica, os valores de  $E_2$  estavam elevados, diminuindo na maturação final e permanecendo com valores baixos durante o estágio regressão (dados não publicados, capítulo 2). Padrão similar ao observado em *S. parahybae* durante o estágio pré-vitelogênico, foi constatado em *Paralichthys olivaceus*, nos quais, sbGnRH (forma efetiva nesta espécie na estimulação de GtHs), aumentou durante a maturação gonadal, confirmando que o eixo hipotálamo-hipófise é necessário para este processo fisiológico (Pham et al., 2006).

Deste modo, o grande obstáculo na aquicultura de conservação de *S. parahybae*, uma espécie ameaçada de extinção, é que estes animais não ovulam espontaneamente sob condições de cultivo (em cativeiro) e, portanto, não desovam. Os altos valores de densidade óptica de cfGnRH durante o estágio vitelogênico e regressão, diferentemente dos animais induzidos a reprodução, sugerem que a falha na ovulação e desova nesta espécie é decorrente de uma falha na liberação de GnRH, que pode ser devido a falta de algum outro estímulo

fisiológico, *i.e.*, modulação pelos neurônios de *kisspeptina* (van Aerle et al., 2008; Zohar et al., 2010); *feedback* dos esteróides sexuais (Colledge, 2008; Zohar et al., 2010), entre outros (revisão: Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010; Zohar et al., 2010). Neste caso, o alto valor de densidade óptica durante o estágio vitelogênico e no acúmulo de GnRH no estágio regressão, foi uma consequência na falta de estímulo para a produção de LH pela hipófise, e posteriormente na falha da produção do hormônio indutor da maturação final e ovulação ( $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one) pelos ovários (Zohar et al., 2010), e consequentemente a não ovulação e desova desses animais em cativeiro.

Adicionalmente, a diminuição dos valores de densidade óptica observada no grupo “reprodução” pode ser decorrente do *feedback* da  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, nos neurônios de *kisspeptina*, que por sua vez, modulou a síntese e secreção de GnRH (Taranger et al., 2010; Zohar et al., 2010). Altos valores de sbGnRH também foram encontrados em *Paralichthys olivaceus* no final do período reprodutivo, quando os animais estavam em regressão (Pham et al., 2006). Similares resultados foram observados em *Pagrus major* (Senthilkumaran et al., 1999), *Scophthalmus maximus* (Anderson et al., 2001) e *Sebastes rastrelliger* (Collins et al., 2001). Neste caso, sugere-se uma análise também nas GtHs de *S. parahybae*, especialmente no LH nestas fases finais de maturação gonadal e no perfil plasmático dos esteróides gonadais, principalmente na  $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, que é o hormônio indutor da maturação final e ovulação na maioria das espécies de teleósteos (Zohar et al., 2010).

No que diz respeito à variação nos valores de densidade óptica para a segunda forma de GnRH (cGnRH-II) em *S. parahybae*, altos valores foram obtidos no estágio regressão, sugerindo algum papel fisiológico durante esta fase do ciclo reprodutivo. Em *C. auratus*, foi demonstrado que cGnRH-II são capazes de aumentar a fragmentação de DNA (apoptose) em testículos maduros (Andreau-Vieyra & Habibi, 2001; Andreau-Vieyra et al., 2005), sugerindo que o GnRH possui um papel autócrino e parácrino na regulação do desenvolvimento testicular. Provavelmente em *S. parahybae*, o cGnRH-II (produção extra encefálica) também possui um papel semelhante nos ovários desta espécie, pois no estágio regressão, foi observado a presença de vários oócitos atrésicos, em processos de absorção e/ou apoptose (dados não publicados, capítulo 2). Adicionalmente, vários estudos apontam a presença de GnRH em gônadas de teleósteos (White & Fernald, 1998; von Schalburg et al., 1999; Gray et al., 2002; Sherwood & Adams, 2005). Em *S. parahybae* também foi identificado, por imunohistoquímica, a presença de GnRH nos ovários (dados não apresentados), o que será investigado futuramente.

Além da estimulação de FSH e LH, o GnRH também está envolvido em outros processos fisiológicos, como na maturação gonadal em Salmoniformes (Amano et al., 1997) e Perciformes (Senthilkumaran et al., 1999), na “smoltificação” (*smoltification*: eventos fisiológicos observados quando as espécies do grupo Salmoniformes que realizam migração entre ambientes aquáticos, ou seja, durante o período em que os animais migram do ambiente dulciaquícola para o ambiente marinho, Parhar & Iwata, 1996), e na diferenciação sexual (Pandolfi et al., 2002; González-Martínez et al., 2002b), além de outros mecanismos fisiológicos (Zohar et al., 2010). Desta forma fica evidente a importância das análises no sistema GnRH de qualquer espécie, tendo como um dos primeiros passos a identificação precisa das regiões encefálicas que sintetizam este neuropeptídeo, especialmente da forma molecular que estimula a liberação de gonadotropinas, demonstrando assim, a importância do presente estudo.

Em resumo, os resultados do presente estudo demonstram claramente que o sistema encefálico de *S. parahybae* apresenta duas diferentes formas de GnRH (cfGnRH e cGnRH-II), e que, os neurônios de cfGnRH estão intimamente relacionados com a modulação da atividade da adeno-hipófise, enquanto os neurônios de cGnRH-II (que não inervam a glândula hipofisária), provavelmente estão relacionados com a neuromodulação e/ou comportamento reprodutivo em *S. parahybae*. Além disso, a co-localização de cfGAP-cfGnRH e cGAP-cGnRH-II, reforçam que os GAPs são ferramentas valiosas nos estudos do sistema GnRHs em qualquer espécie, mesmo distantes filogeneticamente. Ocorrem variações dos neurônios-ir cfGnRH durante o ciclo reprodutivo e após a indução hormonal à reprodução em cativeiro, sugerindo que o insucesso na reprodução em cativeiro seja devido a alguma disfunção endócrina desta forma de GnRH, especialmente na modulação na síntese e/ou liberação de LH. Adicionalmente, mais estudos deverão ser realizados em *S. parahybae*, com o objetivo de esclarecer as possíveis razões para esta disfunção endócrina (ou disfunções), que talvez possam ser aplicadas em outras espécies reofílicas quando impedidas e/ou bloqueadas de realizar a migração reprodutiva, ou seja, quando transferidas ao cativeiro ou quando há presença de obstáculos artificiais (barragens) no decorrer dos rios. Estes estudos devem envolver principalmente a fisiologia do eixo hipófise-gônadas, incluindo análises nos principais esteróides gonadais e nas gonadotropinas durante o ciclo reprodutivo. Futuras investigações adicionadas aos resultados do presente estudo também podem facilitar no cultivo/conservação de *S. parahybae* em cativeiro, uma importante espécie neotropical ameaçada de extinção.

## 5. Agradecimentos

Os autores agradecem principalmente ao Dr. Henk Goos (*Utrecht University*) pela gentileza na doação dos anticorpos para cfGnRH e cfGAP, ao Dr. Gustavo Somoza (*Instituto Tecnológico de Chascomús*), pela doação dos antígenos para os testes de pré-adsorção. A Dra. Fabiana Lo Nostro (*Universidad de Buenos Aires*), pelo auxílio nas análises de imunohistoquímica e de *Western blot*, além das valiosas sugestões nos resultados. Os autores também agradecem a CESP e seus funcionários pelo auxílio nas instalações e manutenção dos reprodutores em cativeiro. Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo: 2007/55494-7 e 2008/57687-0), e pelo Programa Santander de Bolsas de Mobilidade Internacional de Pós-Graduação.

## 6. Referências bibliográficas

- Aldridge, G. M.; Podrebarac, D. M.; Greenough, W. T. & Weiler, I. J. 2008. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J. Neurosci. Meth.* 172: 250-254.
- Amano, M.; Kitamura, S.; Ikuta, K.; Suzuki, Y. & Aida, K. 1997. Activation of salmon GnRH mRNA expression prior to differentiation of precocious males in Masu salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105: 365-371.
- Amano, M.; Oka, Y.; Aida, K.; Okumoto, N.; Kawashima, S. & Hasegawa, Y. 1991. Immunocytochemical demonstration of salmon GnRH and chicken GnRH-II in the brain of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *J. Comp. Neurol.* 314: 587-597.
- Amano, M.; Oka, Y.; Yamanome, T.; Okuzawa, K. & Yamamori, K. 2002. Three GnRH systems in the brain and pituitary of a pleuronectiform fish, the barfin flounder *Verasper moseri*. *Cell Tissue Res.* 309: 323-329.
- Anderson, E.; Fjellidal, P. G.; Klenke, U.; Vikingstad, E.; Taranger, G. L.; Zohar, Y. & Stefansson, S. O. 2001. Three form of GnRH in the brain and pituitary of the turbot, *Scophthalmus maximus*: immunological characterization and seasonal variation. *Comp. Biochem. Physiol.* 129B: 551-558.
- Andreau-Vieyra, C. V. & Habibi, H. R. 2001. Effects of salmon GnRH and chicken GnRH-II on testicular apoptosis in goldfish (*Carassius auratus*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 129: 483-487.

- Andreau-Vieyra, C. V.; Buret, A. G. & Habibi, H. R. 2005. Gonadotropin-releasing hormone induction of apoptosis in the testes of goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* 146: 1588-1596.
- Anglade, I.; Zandbergen, T. & Kah, O. 1993. Origin of the pituitary innervation in the goldfish. *Cell Tissue Res.* 273: 345-355.
- van Arle, R.; Kille, P.; Lange, A. & Tyler, C. R. 2008. Evidence for the existence of a functional kiss1/kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides* 29: 57-64.
- Behmer, O. A.; Tolosa, E. M. C. & Neto, A. G. F. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART, São Paulo, Livraria Editora Ltda. 239p.
- Bennis, M.; Dubourg, P.; Gamrani, H.; Calas, A. & Kah, O. 1989. Existence of a GnRH immunoreactive in the dorsal midbrain tegmentum of the chameleon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75: 195-203.
- Bogerd, J.; Li, K. W.; Janssen-Dommerholt, C. & Goos, H. 1992. Two gonadotropin-releasing hormones from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biochem. Bioph. Res. Co.* 187: 127-134.
- Bogerd, J.; Zandbergen, T.; Anderson, E. & Goos, H. 1994. Isolation, characterization and expression of cDNAs encoding the catfish-type and chicken-II-type gonadotropin-releasing-hormone precursors in the African catfish. *Eur. J. Biochem.* 222: 541-549.
- Cánepa, M.; Pandolfi, M.; Maggese, M. C. & Vissio, P. G. 2006. Involvement of somatolactin in background adaptation of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *J. Exp. Zool.* 305A: 410-419.
- Cánepa, M.; Pozzi, A.; Astola, A.; Maggese, M. C. & Vissio, P. 2008. Effect of salmon melanin-concentrating hormone and mammalian gonadotropin-releasing hormone on somatolactin release in pituitary culture of *Cichlasoma dimerus*. *Cell Tissue Res.* 333: 49-59.
- Caneppele, D., Honji, R. M.; Hilsdorf, A. W. S. & Moreira, R. G. 2009. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotrop. Ichthyol.* 7(4): 759-762.
- Carolsfeld, J.; Powell, J. F.; Park, M.; Fischer, W. H.; Craig, A. G.; Chang, J. P.; Rivier, J. E. & Sherwood, N. M. 2000. Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, from an ancient teleost, herring. *Endocrinology* 141: 505-512.



- Cerdá-Reverter, J. M.; Muriach, B.; Zanuy, S. & Muñoz-Cueto, J. A. 2008. A cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): the midbrain and hindbrain. *Acta Histochem.* 110: 433-450.
- Cerdá-Reverter, J. M.; Zanuy, S. & Muñoz-Cueto, J. A. 2001a. Cytoarchitectonic study of the brain of a Perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): I. the telencephalon. *J. Morphol.* 247: 217-228.
- Cerdá-Reverter, J. M.; Zanuy, S. & Muñoz-Cueto, J. A. 2001b. Cytoarchitectonic study of the brain of a Perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): II. the diencephalon. *J. Morphol.* 247: 229-251.
- Colledge, W. H. 2008. GPR54 and kisspeptins. *Results Probl. Cell. Differ.* 46: 117-143.
- Collins, P. M.; O'Neill, D. F.; Barron, B. R.; Moore, R. K. & Sherwood, N. M. 2001. Gonadotropin-releasing hormone content in the brain and pituitary of male and female grass rockfish (*Sebastes rastrelliger*) in relation to seasonal changes in reproductive status. *Biol. Reprod.* 65: 173-179.
- Dittmer, A. & Dittmer, J. 2006.  $\beta$ -Actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis* 27: 2844-2845.
- Dubois, E. A.; Zandbergen, M. A.; Peute, J. & Goos, H. 2002. Evolutionary development of three gonadotropin releasing hormone (GnRH) systems in vertebrate. *Brain Res. Bull.* 57(3/4): 413-418.
- Dubois, E. A.; Zandbergen, M. A.; Peute, J.; Bogerd, J. & Goos, H. J. T. 2001. Development of three distinct GnRH neuron populations expressing two different GnRH forms in the brain of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *J. Comp. Neurol.* 437: 308-320.
- Fiszbein, A.; Cánepa, M.; Vázquez, G. R.; Maggese, C. & Pandolfi, M. 2010. Photoperiodic modulation of reproductive physiology and behavior in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Physiol. Behav.* 99: 425-432.
- Garavello, J. C. 2005. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotrop. Ichthyol.* 3(4): 607-623.
- van Gils, J.; Absil, P.; Grauwels, L.; Moons, L.; Vandesande, F. & Balthazart, J. 1993. Distribution of luteinizing hormone-releasing hormones I and II (LHRH-I and -II) in the quail and chicken brain as demonstrated with antibodies directed against synthetic peptides. *J. Comp. Neurol.* 334: 304-323.
- González-Martínez, D.; Madigou, T.; Zmora, N.; Anglade, I.; Zanuy, S.; Zohar, Y.; Elizur, A.; Muñoz-Cueto, J. A. & Kah, O. 2001. Differential expression of three different

- prepo-GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Comp. Neurol.* 429: 144-155.
- González-Martínez, D.; Zmora, N.; Mañanos, E.; Saligaut, D.; Zanuy, S.; Zohar, Y.; Elizur, A.; Kah, O. & Muñoz-Cueto, J. A. 2002a. Immunohistochemical localization of three different prepo-GnRHs in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides. *J. Comp. Neurol.* 446: 95-113.
- González-Martínez, D.; Zmora, N.; Saligaut, D.; Zanuy, S.; Elizur, A.; Kah, O. & Muñoz-Cueto, J. A. 2004. New insights in development origins of different GnRH (gonadotropin-releasing hormone) systems in perciform fish: an immunohistochemical study in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Chem. Neuroanat.* 28: 1-15.
- González-Martínez, D.; Zmora, N.; Zanuy, S.; Sarasquete, C.; Elizur, A.; Kah, O. & Muñoz-Cueto, J. A. 2002b. Developmental expression of three different prepo-GnRH (gonadotropin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Chem. Neuroanat.* 23: 255-267.
- Goos, H.; Bosma, P. T.; Bogerd, J.; Tensen, C. P.; Li, K. W.; Zandbergen, M. A. & Schulz, R. W. 1997. Gonadotropin-releasing hormones in the African catfish: molecular forms, localization, potency and receptors. *Fish Physiol. Biochem.* 17: 45-51.
- Gorbman, A. & Sower, S. A. 2003. Evolution of the role of GnRH in animal (Metazoan) biology. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134: 207-213.
- Gray, S. L.; Adams, B. A.; Warby, C. M.; von Schalburg, K. R. & Sherwood, N. M. 2002. Transcription and translation of the salmon gonadotropin-releasing hormone genes in brain and gonads of sexually maturing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* 67: 1621-1627.
- Grober, M. S.; Fox, S. H.; Laughlin, C. & Bass, A. H. 1994. GnRH cell size and number in a teleost fish with two male reproductive morphs: sexual maturation, final sexual status and body size allometry. *Brain Behav. Evolut.* 43: 61-78.
- Guilgur, L. G.; Moncaut, N. P.; Canario, A. V. M. & Somoza, G. M. 2006. Evolution of GnRH ligands and receptors in Gnathostomata. *Comp. Biochem. Physiol.* 144A: 272-283.
- Guilgur, L. G.; Orti, G.; Strobl-Mazzulla, P. H.; Fernandino, J. I.; Miranda, L. A. & Somoza, G. M. 2007. Characterization of the cDNAs encoding three GnRH forms in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes) and the evolution of GnRH precursors. *J. Mol. Evol.* 64: 614-627.

- Holland, M. C. H.; Gothilf, Y.; Meiri, I.; King, J. A.; Okuzawa, K.; Elizur, A. & Zohar, Y. 1998. Levels of the native forms of GnRH in the pituitary of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, at several characteristic stages of the gonadal cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 394-405.
- Honji, R. M.; Caneppele, D.; Hilsdorf, A. W. S. & Moreira, R. G. 2009. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). *Environ. Biol. Fish.* 85(3): 207-208.
- Kah, O.; Breton, B.; Dulka, J. G.; Núñez-Rodríguez, J.; Peter, R. E.; Corrigan, A.; Rivier, J. E. & Vale, W. W. 1986. A reinvestigation of the GnRH (gonadotropin-releasing hormone) systems in the goldfish brain using antibodies to salmon GnRH. *Cell Tissue Res.* 244: 327-333.
- Kah, O.; Lethimonier, C.; Somoza, G.; Guilgur, L. G.; Vaillant, C. & Lareyre, J. J. 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153: 346-364.
- Lescheid, D. W.; Terasawa, E.; Abler, L. A.; Urbanski, H. F.; Warby, C. M.; Millar, R. P. & Sherwood, N. M. 1997. A second form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) with characteristics of chicken GnRH-II is present in the primate brain. *Endocrinology* 138: 5618-5629.
- Lethimonier, C.; Madigou, T.; Muñoz-Cueto, J. A.; Lareyre, J. J. & Kah, O. 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptor in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135: 1-16.
- Levavi-Sivan, B.; Bogerd, J.; Mañanós, E. L.; Gómez, A. & Lareyre, J. J. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 412-437.
- Miranda, L. A.; Strobl-Mazzulla, P. H.; Strussmann, C. A.; Parhar, I. & Somoza, G. M. 2003. Gonadotropin-releasing hormone neuronal development during the sensitive period of temperature sex determination in the pejerrey fish, *Odontesthes bonariensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132: 444-453.
- Montaner, A. D.; Park, M.; Fischer, W. H.; Craig, A. G.; Chang, J. P.; Somoza, G. M.; Rivier, J. E. & Sherwood, N. M. 2001. Primary structure of a novel gonadotropin-releasing hormone (GnRH) variant in the brain of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Endocrinology* 142: 1453-1460.
- Montero, M.; Vidal, B.; Vandesande, F.; King, J. A.; Tramu, G.; Dufour, S. & Kah, O. 1994. Comparative distribution of mammalian GnRH (gonadotropin-releasing hormone) and chicken GnRH-II in the brain of the European eel. *J. Chem. Neuroanat.* 7: 227-241

- Morgan, K. & Millar, R. P. 2004. Evolution of GnRH ligand precursors and GnRH receptors in protochordate and vertebrate species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139: 191-197.
- Münz, H. P.; Stumpf, W. E. & Jenness, L. 1981. LHRH systems in the brain of platyfish. *Brain Res.* 221: 1-13
- Mylonas, C. C.; Fostier, A. & Zanuy, S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 516-534.
- Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the World*. 4 Ed. New York. Wiley – Interscience. 601p.
- Ngamvongchon, S.; Sherwood, N. M.; Warby, C. M. & Rivier, J. E. 1992. Gonadotropin-releasing hormone from Thai catfish: chromatographic and physiological studies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 87: 266-274.
- Oka, Y. 1997. GnRH neuronal system of fish brain as a model system for the study of peptidergic neuromodulation. Pp: 245-276. In: Parhar, I. & Sakuma, Y. (Eds.). *GnRH neurons: gene to behavior*. Brain Shuppan, Tokyo.
- Okubo, K. & Nagahama, Y. 2008. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiol.* 193: 3-15.
- Okubo, K.; Amano, M.; Yoshiura, Y.; Suetake, H. & Aida, K. 2000. A novel form of gonadotropin-releasing hormone in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 298-303.
- Pandolfi, M.; Muñoz-Cueto, J. A.; Lo Nostro, F. L.; Downs, J. L.; Paz, D. A.; Maggese, M. C. & Urbanski, H. F. 2005. GnRH systems of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae) revisited: a localization study with antibodies and riboprobes to GnRH-associated peptides. *Cell Tissue Res.* 321: 219-232.
- Pandolfi, M.; Parhar, I.; Ravaglia, M. A.; Meijide, F. J.; Maggese, C. C. & Paz, D. A. 2002. Ontogeny and distribution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems in the brain of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Anat. Embryol.* 205: 271-281.
- Parhar, I. S. & Iwata, M. 1996. Intracerebral expression of gonadotropin-releasing hormone and growth hormone-releasing hormone is delayed until smoltification in the salmon. *Neurosci. Res.* 26: 299-308.
- Park, M. K. & Wakabayashi, K. 1986. Preparation of a monoclonal antibody to common amino acid sequence of LHRH and its application. *Endocrinol. Japon.* 33(2): 257-272.
- Pham, K. X.; Amano, M.; Amiya, N.; Kurita, Y. & Yamamori, K. 2006. Changes in brain and pituitary GnRH levels during ovarian maturation in wild female Japanese flounder. *Fish Physiol. Biochem.* 32: 241-248.

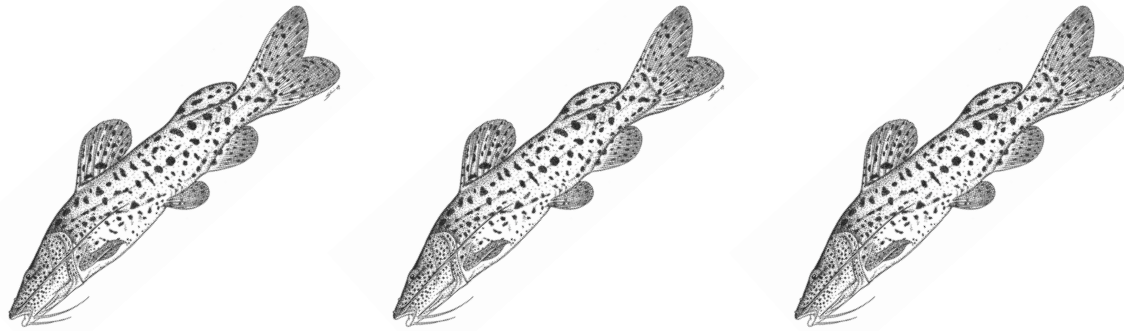
- Powell, J. F. F.; Standen, E. M.; Carolsfeld, J.; Borella, M. I.; Gazola, R.; Fischer, W. H.; Park, M.; Craig, A. G.; Warby, C. M.; Rivier, J. E.; Val-Sella, M. V. & Sherwood, N. M. 1997. Primary structure of three forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the pacu brain. *Regul. Peptides*. 68: 189-195.
- Powell, J. F.; Zohar, Y.; Elizur, A.; Park, M.; Fisher, W. H.; Craig, A. G.; Rivier, J. E.; Lovejoy, D. A. & Sherwood, N. 1994. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 12081-12085.
- Romero-Calvo, I.; Ocón, P.; Martínez-Moya, P.; Suárez, M. D.; Zarzuelo, A.; Martínez-Augustin, O. & Medina, F. S. 2010. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem*. 401: 318-320.
- Saha, S. & Subhedar, N. 2011. Calcitonin-like immunoreactivity in the subcommissural organ-Reissner's fiber complex of some freshwater and marine teleosts. *J. Chem. Neuroanat*. 41: 122-128.
- Saha, S. G.; Jain, M. R. & Subhedar, N. 2000. Subcommissural organ-Reissner's fiber complex of the teleost *Clarias batrachus* responds to GABA treatment. *Brain Res*. 852: 335-343.
- von Schalburg, K. R.; Harrower, W. L. & Sherwood, N. M. 1999. Regulation and expression of gonadotropin-releasing hormone in salmon embryo and gonad. *Mol. Cell. Endocrinol*. 157: 41-54.
- Schulz, R. W.; Bosma, P. T.; Zandbergen, M. A.; Van der Sanden, M. C. A.; Dijk, W. V.; Bogerd, J. & Goos, H. J. 1993. Two gonadotropin-releasing hormones in the African catfish, *Clarias gariepinus*: localization, pituitary, receptor binding and gonadotropin release activity. *Endocrinology* 133: 1569-1577.
- Senthilkumaran, B.; Okuzawa, K.; Gen, K.; Ookura, T. & Kagawa, H. 1999. Distribution and seasonal variations in levels of three native GnRHs in the brain and pituitary of perciform fish. *J. Neuroendocrinol*. 11: 181-186.
- Servili, A.; Lethimonier, C.; Lareyre, J.; López-Olmeda, J. F.; Sánchez-Vázquez, F. J.; Kah, O. & Muñoz-Cueto, J. A. 2010. The highly conserved gonadotropin-releasing hormone-2 form acts as a melatonin-releasing factor in the pineal of a teleost fish, the European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Neuroendocrinology* 151: 2265-2275.
- Sherwood, N. M. & Adams, B. A. 2005. Gonadotropin-releasing hormone in fish: evolution, expression and regulation of the GnRH gene. Pp: 1-39. In: Sherwood, N. & Melamed,

- P. (Eds.). Hormones and their receptors in fish reproduction. Mol. Aspec. Fish Mar. Biol.
- Sherwood, N.; Eiden, L.; Brownstein, M.; Spiess, J.; Rivier, J. & Vale, W. 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 2794-2798.
- Somoza, G. M.; Lescheid, D. W.; Miranda, L. A.; Lo Nostro, F. L.; Magliulo-Cepriano, L.; Montaner, A. D.; Schreibman, M. P.; Rivier, J. E. & Sherwood, N. M. 2002b. Expression of pejerrey gonadotropin-releasing hormone in three Orders of fish. Biol. Reprod. 67: 1864-1871.
- Somoza, G. M.; Miranda, L. A.; Strobl-Mazzulla, P. & Guilgur, L. G. 2002a. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): from fish to mammalian brains. Cel. Mol. Neurobiol. 22: 589-609.
- Stéfano, A. V.; Aldana-Marcos, H. J.; Affani, J. M. & Somoza, G. M. 2000. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems in the pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). Fish Physiol. Biochem. 23: 215-223.
- Subhedar, N. & Rama-Krishna, N. S. 1988. Immunocytochemical localization of LH-RH in the brain and pituitary of the catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). Gen. Comp. Endocrinol. 72: 431-442.
- Taranger, G. L.; Carrillo, M.; Schulz, R. W.; Fontaine, P.; Zanuy, S.; Felip, A.; Weltzien, F.; Dufour, S.; Karlsen, Ø.; Norberg, B.; Andersson, E. & Hansen, T. 2010. Control of puberty in farmed fish. Gen. Comp. Endocrinol. 165: 483-515.
- Urbanski, H. F.; White, R. B.; Fernald, R. D.; Kohama, S. G.; Garyfallou, V. T. & Densmore, V. S. 1999. Regional expression of mRNA encoding a second form of gonadotrophin-releasing hormone in the macaque brain. Endocrinology 140: 1945-1948.
- Vazzoler, A. E. A. M. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. EDUEM, Maringá. 169p.
- Venkatesh, B. 2003. Evolution and diversity of fish genomes. Curr. Opin. Genet. Dev. 13: 588-592.
- White, R. B. & Fernald, R. D. 1998. Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormone genes in on species. Gen. Comp. Endocrinol. 112: 17-25.
- Wikelski, M. & Cooke, S. J. 2006. Conservation physiology. Trends Ecol. Evol. 21(2): 38-46.
- Yu, K. L.; Nahorniak, C. S.; Peter, R. E.; Corrigan, A.; Rivier, J. E. & Vale, W. W. 1987. Brain distribution of radioimmunoassayable gonadotropin-releasing hormone in

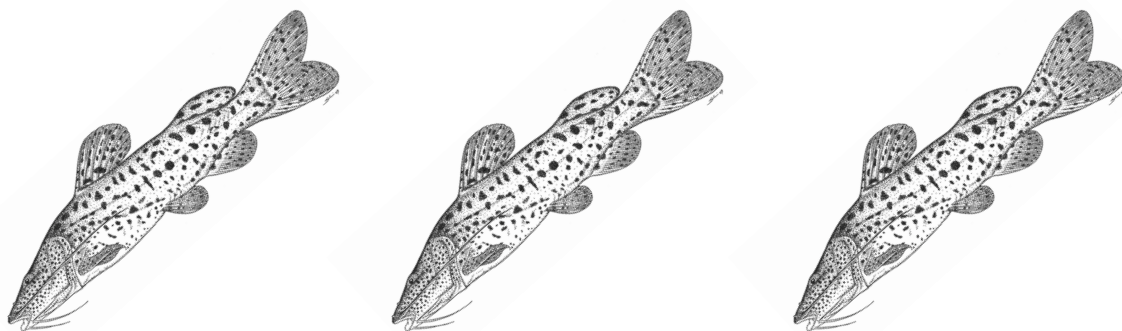
- female goldfish: seasonal variation and periovulatory changes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 67: 234-246.
- Yu, K. L.; Sherwood, N. M. & Peter, R. E. 1988. Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of the goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides* 9: 625-630.
- Zandbergen, M. A.; Kah, O.; Bogerd, J.; Peute, J. & Goos, H. J. 1995. Expression and distribution of two gonadotropin-releasing hormone in the catfish brain. *Neuroendocrinology* 62: 571-578.
- Zar, J. H. 2010. *Biostatistical analysis*. New Jersey. Prentice Hall. 718p.
- Zhang, L.; Tello, J. A.; Zhang, W. & Tsai, P. 2008. Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a gonadotropin-releasing hormone-like molecule in the gastropod mollusk, *Aplisia californica*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156: 201-209.
- Zohar, Y. & Mylonas, C. C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99-136.
- Zohar, Y.; Muñoz-Cueto, J.; Elizur, A. & Kah, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 438-455.







**TABELAS: CAPÍTULO 4**





**Tabela 1.** *Steindachneridion parahybae* – Anticorpos primários e secundários utilizados nas reações de imuno-histoquímica.

Anticorpo primário	Diluição	Fonte	Anticorpo secundário	Diluição
<i>Clarias gariepinus</i> (cfGnRH)	1:1000	Dr. H. Goos	<i>anti-rabbit</i>	1:600
<i>Clarias gariepinus</i> (cfGAP)	1:500	Dr. H. Goos	<i>anti-rabbit</i>	1:600
<i>Oreochromis mossambicus</i> (sGnRH)	1:1000	Dr. I. Parhar	<i>anti-rabbit</i>	1:600
<i>Dicentrarchus labrax</i> (sGAP)	1:500	Dr. J. Muñoz-Cueto	<i>anti-guinea pig</i>	1:600
<i>Oreochromis mossambicus</i> (cGnRH-II)	1:1000	Dr. I. Parhar	<i>anti-rabbit</i>	1:600
<i>Dicentrarchus labrax</i> (cGAP-II)	1:500	Dr. J. Muñoz-Cueto	<i>anti-guinea pig</i>	1:600
LRH <sub>13</sub> (monoclonal)	1:1500	Dr. K. Wakabayashi	<i>anti-mouse</i>	kit DAKO

Todos os anticorpos utilizados neste trabalho foram doados gentilmente pelos seus respectivos autores.

**Tabela 2.** *Steindachneridion parahybae* – Anticorpos primários e secundários utilizados nas reações de *Western blot*.

Anticorpo primário	Diluição	Fonte	Anticorpo secundário	Diluição
<i>Clarias gariepinus</i> (cfGAP)	1:4000	Dr. H. Goos	<i>anti-rabbit</i>	1:2000
<i>Dicentrarchus labrax</i> (cGAP-II)	1:4000	Dr. J. Muñoz-Cueto	<i>anti-guinea pig</i>	1:2000

Todos os anticorpos utilizados neste trabalho foram doados gentilmente pelos seus respectivos autores.

**Tabela 3.** *Steindachneridion parahybae* – Distribuição morfométrica e ponderal e Índice gonadossomático (IGS) por estágio de maturação. Média  $\pm$  erro padrão da média.

Estádio de maturação	N	Comprimento padrão (cm): min-max	Comprimento padrão (cm): média	Massa corpórea (g)	IGS
Pré-vitelogênico	28	29,00 - 40,50	35,93 $\pm$ 0,64	698,52 $\pm$ 29,50	0,40 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>
Vitelogênico	22	29,50 - 40,50	34,50 $\pm$ 0,55	596,66 $\pm$ 25,35	1,59 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>
Regressão	18	30,00 - 38,50	33,61 $\pm$ 0,46	603,85 $\pm$ 29,97	0,57 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
Reprodução	6	32,50 - 33,00	33,07 $\pm$ 0,09	541,67 $\pm$ 8,08	1,61 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes.

**Tabela 4.** *Steindachneridion parahybae* – Diâmetro celular e nuclear de neurônios-ir em várias regiões encefálicas. Média  $\pm$  erro padrão da média. (**Tel**, telencéfalo; **HBM**, hipotálamo médio basal; **MB**, cérebro médio).

Região encefálica	cfGAP		cGAP-II	
	diâmetro celular médio ( $\mu\text{m}$ )	diâmetro nuclear médio ( $\mu\text{m}$ )	diâmetro celular médio ( $\mu\text{m}$ )	diâmetro nuclear médio ( $\mu\text{m}$ )
Anterior (Tel)	16,54 $\pm$ 0,32*	9,16 $\pm$ 0,53*	NI	NI
Posterior (HBM)	25,11 $\pm$ 0,58**	12,13 $\pm$ 0,45**	NI	NI
Posterior (MB)	NI	NI	24,02 $\pm$ 0,42	9,72 $\pm$ 0,28

\* Símbolos diferentes significam valores estatisticamente diferentes.

**Tabela 5.** *Steindachneridion parahybae* – Diâmetro celular e nuclear de neurônios-ir durante o ciclo reprodutivo e após a reprodução em cativeiro. Média  $\pm$  erro padrão da média.

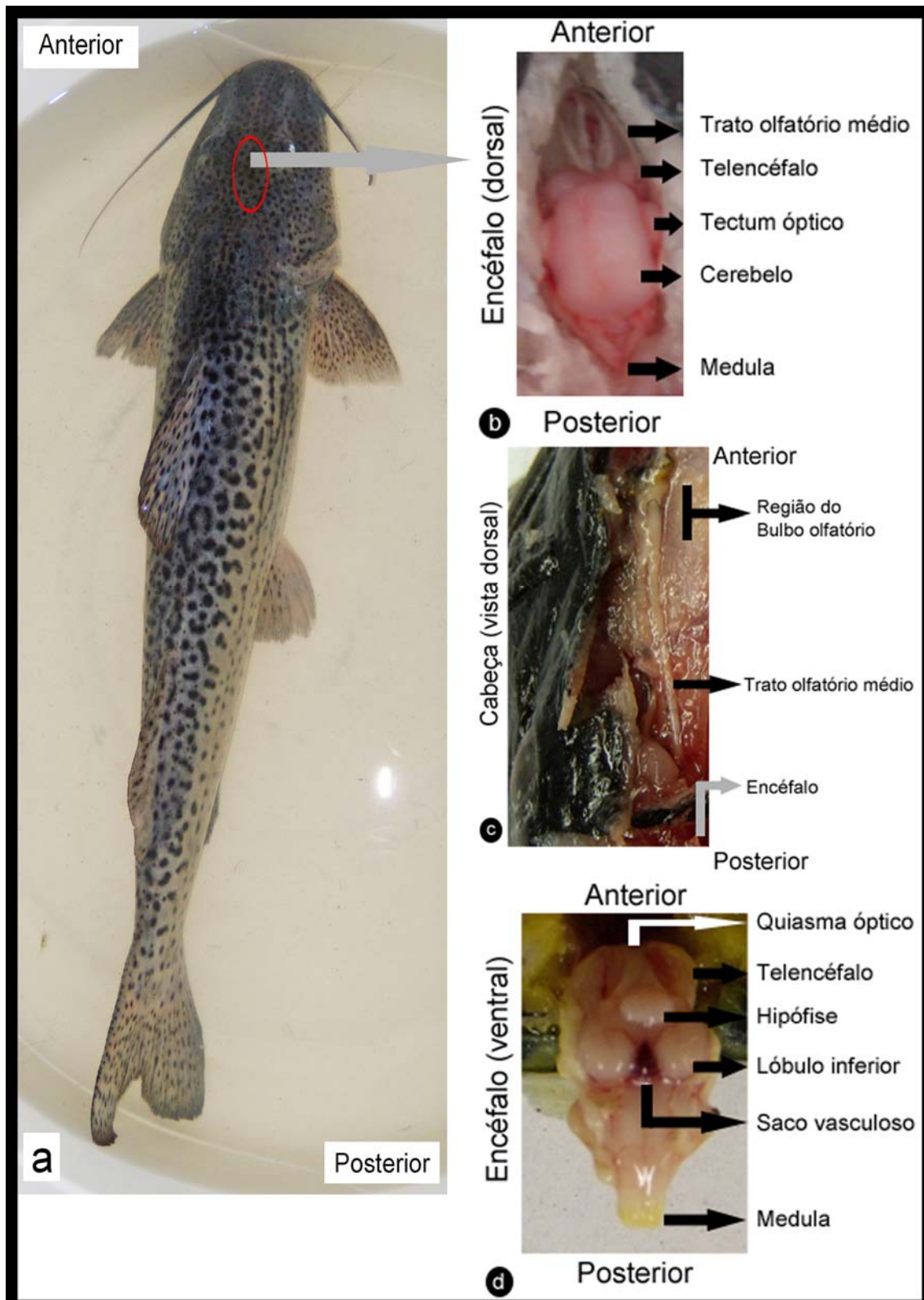
Estádio de maturação	cfGAP		cGAP-II	
	diâmetro celular médio ( $\mu\text{m}$ )	diâmetro nuclear médio ( $\mu\text{m}$ )	diâmetro celular médio ( $\mu\text{m}$ )	diâmetro nuclear médio ( $\mu\text{m}$ )
Pré-vitelogênico	25,30 $\pm$ 0,99	11,62 $\pm$ 1,15	24,53 $\pm$ 0,99	9,84 $\pm$ 0,23
Vitelogênico	26,04 $\pm$ 1,53	14,43 $\pm$ 1,33	22,66 $\pm$ 0,84	9,60 $\pm$ 0,53
Regressão	23,44 $\pm$ 1,20	11,41 $\pm$ 0,95	23,73 $\pm$ 0,66	10,63 $\pm$ 1,51
Reprodução	24,90 $\pm$ 5,65	11,98 $\pm$ 0,44	25,77 $\pm$ 0,88	9,24 $\pm$ 0,58



**FIGURAS: CAPÍTULO 4**



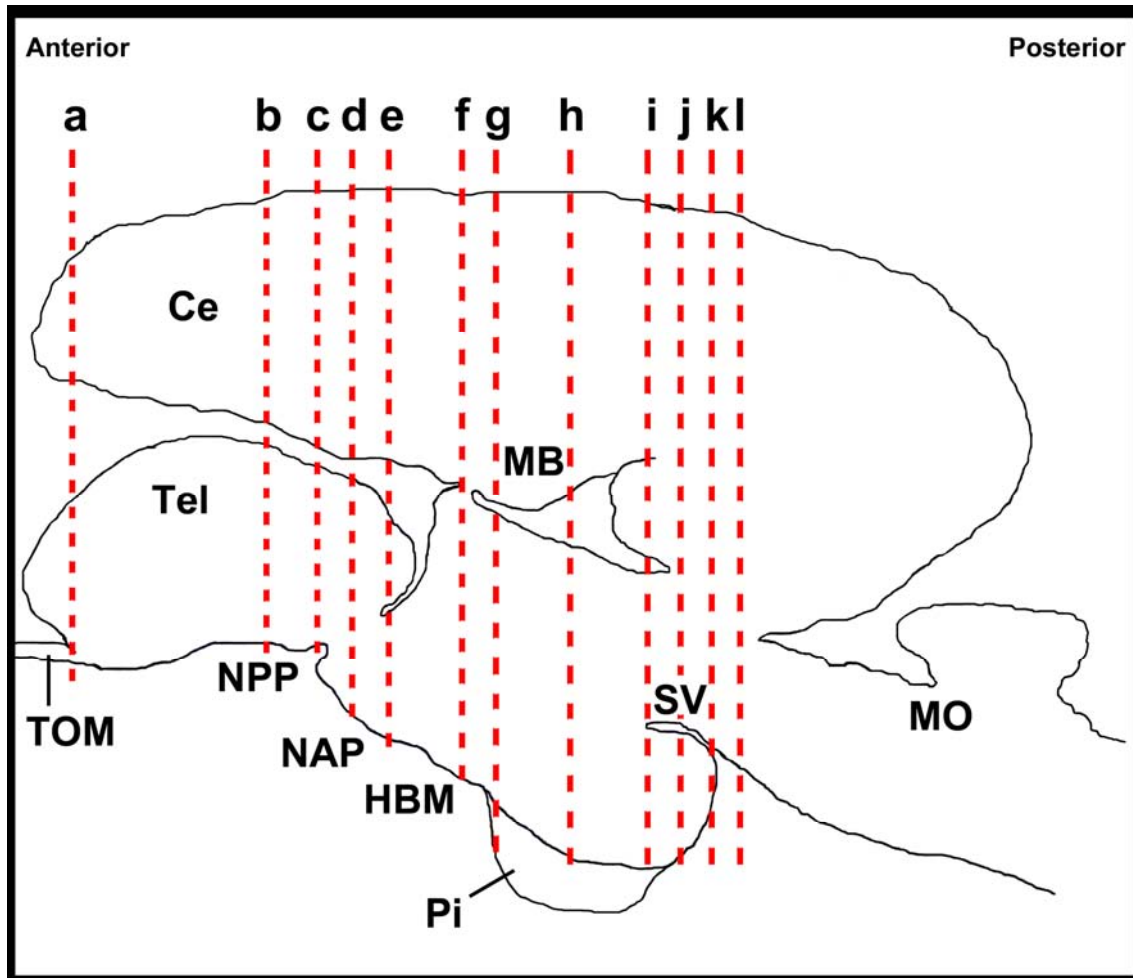




**Fig. 1.** *Steindachneridion parahybae*: vista geral do encéfalo de uma fêmea adulta do surubim do Paraíba. a) localização macroscópica do encéfalo de *S. parahybae*. b) Remoção da porção superior da caixa craniana, com intuito de observar a localização do encéfalo (vista dorsal) e

das principais regiões do sistema nervoso central. c) Localização mais anterior da região do bulbo olfatório. Este é conectado com o encéfalo pelo trato olfatório médio. Característica de Siluriformes. d) Encéfalo destacado da caixa craniana e direcionado para a região posterior da cabeça, para a visualização da hipófise e das regiões ventrais do sistema nervoso central.





**Fig. 2.** *Steindachneridion parahybae*: Esquema da visão lateral do encéfalo do surubim do Paraíba. As linhas pontilhadas indicam os níveis dos cortes histológicos transversais apresentados na figura 3. **Ce**, cerebelo; **HBM**, hipotálamo médio basal; **MB**, cérebro médio; **MO**, medula oblonga; **NAP**, núcleo anterior periventricular; **NPP**, núcleo periventricular; **Pi**, hipófise; **SV**, saco vasculoso; **Tel**, telencéfalo; **TOM**, trato olfatório médio.



Figura 3.

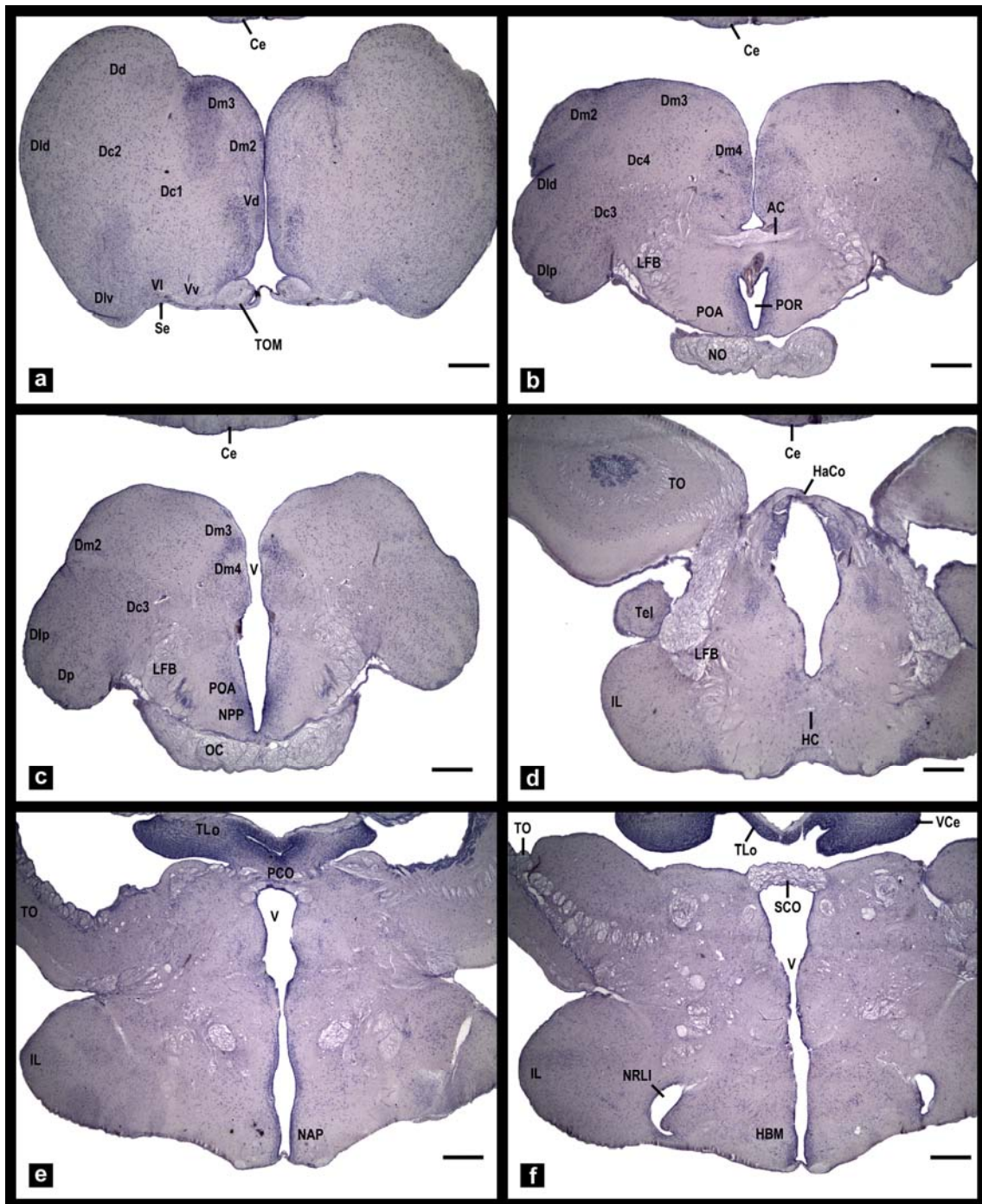
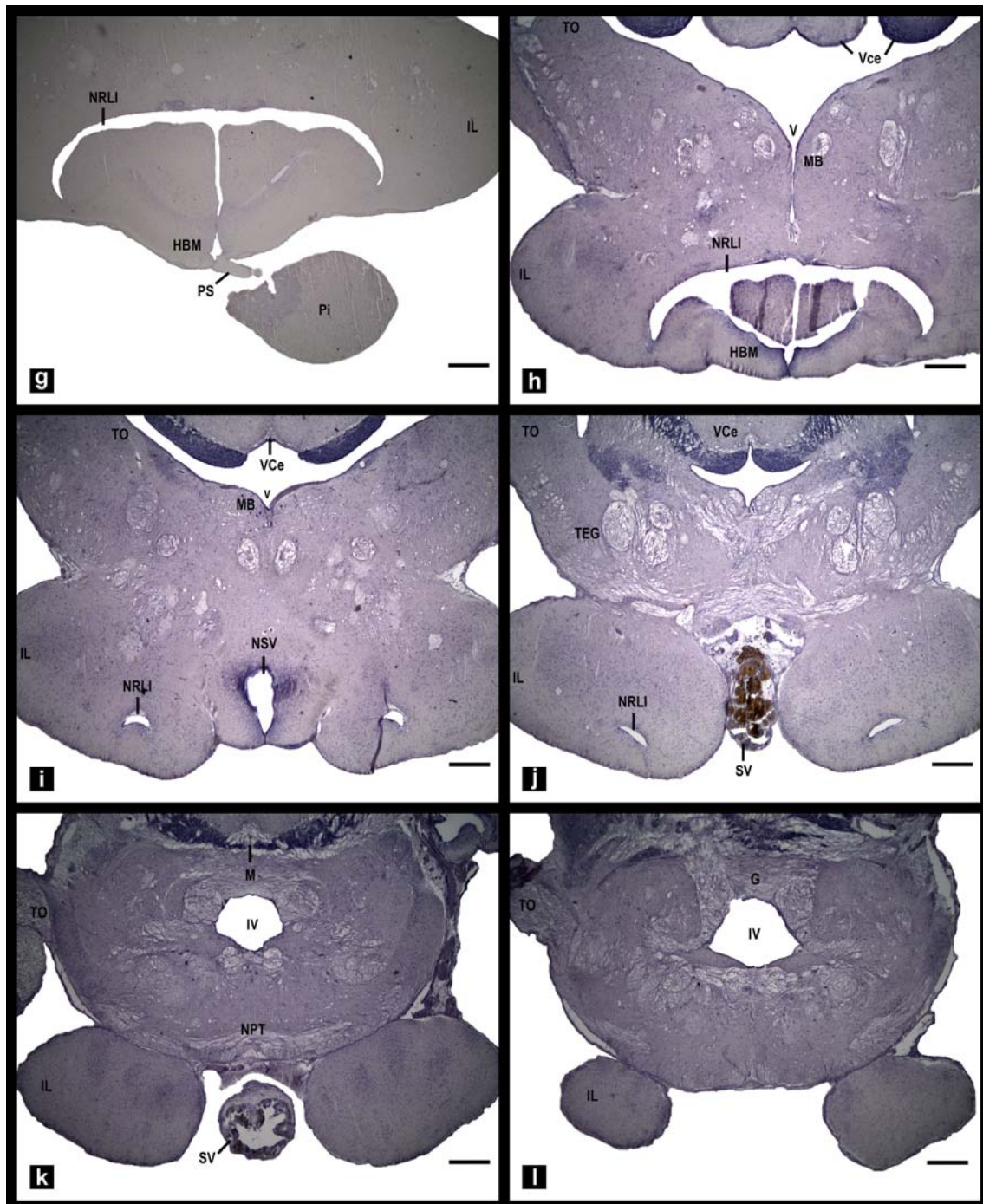




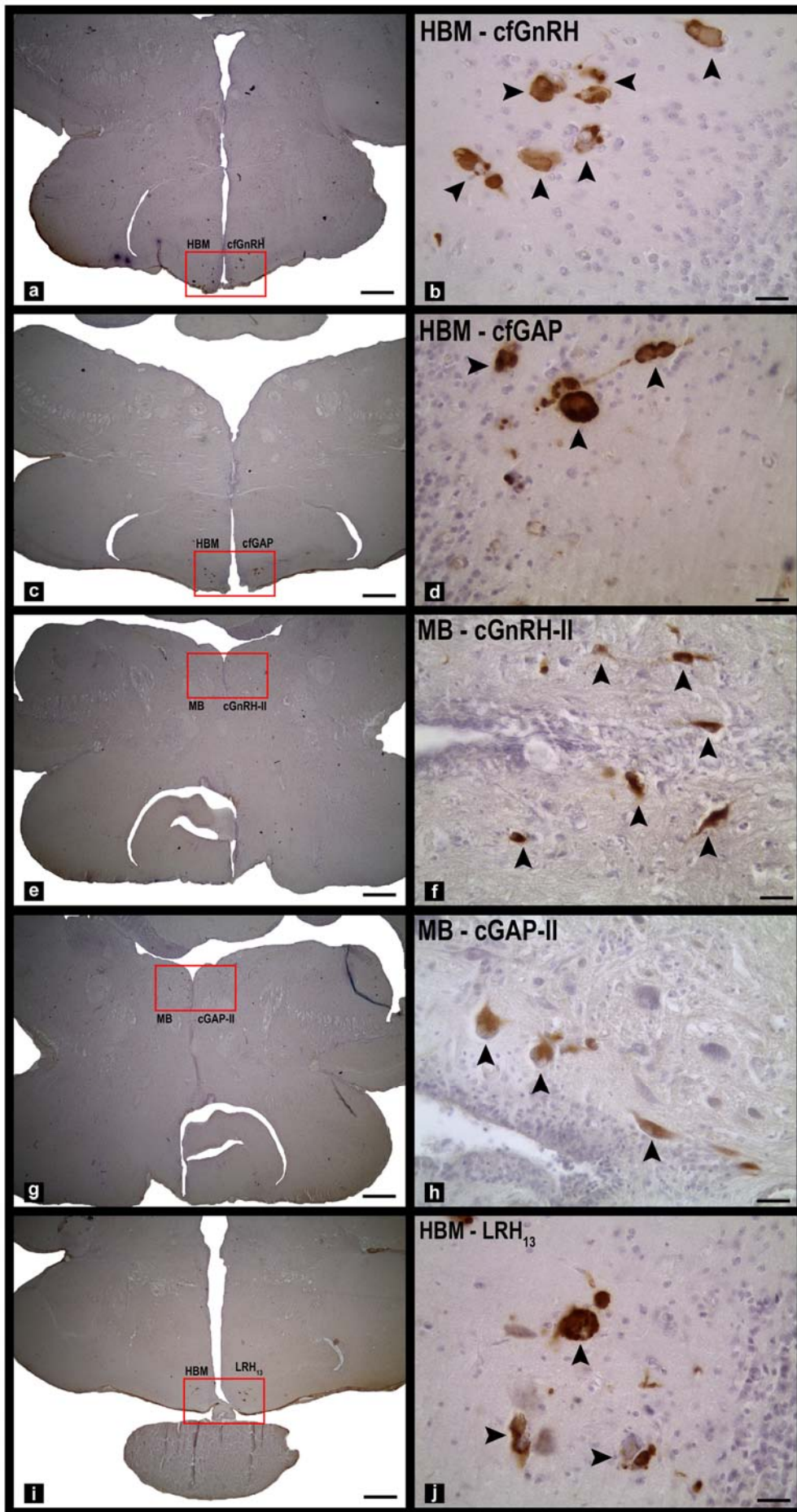
Figura 3. continuação



**Fig. 3.** *Steindachneridion parahybae* (exemplar no estágio de desenvolvimento gonadal: vitelogênico): Descrição de cortes histológicos no encéfalo do surubim do Paraíba, da região anterior, rostral (a) para região posterior, caudal (l). Coloração com hematoxilina ácida. a) Principais subdivisões do telencéfalo (dorsal e ventral) e seus respectivos núcleos; b-e) Região da área pré-óptica e seus principais núcleos: periventricular e anterior periventricular;

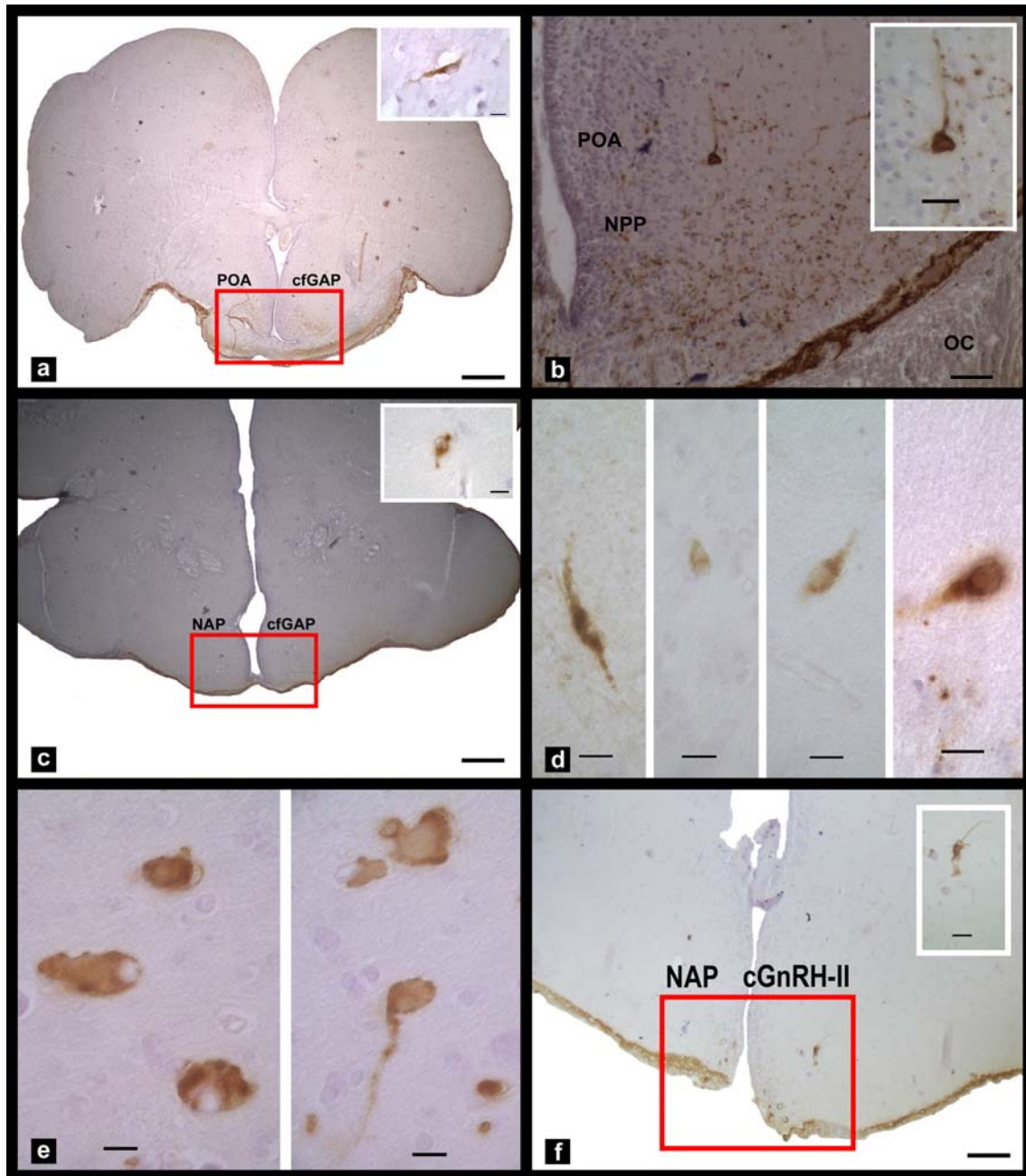
f-g) Região do hipotálamo médio basal, pedúnculo hipofisário e hipófise; h-i) Região do cérebro médio; j-k) Região do saco vascular; l) Região posterior do encéfalo, próximo ao quarto ventrículo e medula oblonga. **AC**, comissura anterior; **Ce**, cerebelo; **Dc 1-4**, telencéfalo dorsal núcleo área central; **Dd**, telencéfalo dorsal área dorsal; **Dld**, telencéfalo dorsal área lateral; **Dlp**, telencéfalo dorsal área lateral posterior; **Dlv**, telencéfalo dorsal área lateral ventral; **DM 2-4**, telencéfalo dorsal área medial; **Dp**, telencéfalo dorsal área posterior; **G**, camada granular do cerebelo; **HaCo**, comissura habenular; **HBM**, hipotálamo médio basal; **HC**, comissura horizontal; **IL**, lobo inferior; **IV**, quarto ventrículo; **LFB**, feixe do *forebrain* lateral; **M**, camada molecular do cerebelo; **MB**, cérebro médio; **NAP**, núcleo anterior periventricular; **NO**, nervo óptico; **NPP**, núcleo periventricular; **NPT**, núcleo tuberal posterior; **NRLI**, recesso lateral do núcleo lateral; **NSV**, núcleo do saco vascular; **OC**, quiasma óptico; **PCO**, comissura continuação da legenda: posterior; **Pi**, hipófise; **POA**, área pré-óptica; **POR**, recesso pré-óptico; **PS**, pedúnculo hipofisário; **SCO**, órgão subcomissural; **Se**, sulco externo; **SV**, saco vascular; **TEG**, tegumento; **Tel**, telencéfalo; **Tlo**, torus longitudinalis; **TO**, tecto óptico; **TOM**, trato olfatório médio; **V**, terceiro ventrículo; **VCe**, válvula do cerebelo; **Vd**, telencéfalo ventral núcleo dorsal; **VI**, telencéfalo ventral núcleo lateral; **Vv**, telencéfalo ventral núcleo área ventral. Barra: 400µm.

Figura 4.



**Fig. 4.** *Steindachneridion parahybae* (exemplar no estágio de desenvolvimento gonadal: vitelogênico): Reações de imuno-histoquímicas (cfGnRH, cfGAP, cGnRH-II, cGAP-II e LRH<sub>13</sub>), no encéfalo do surubim do Paraíba. Regiões do hipotálamo médio basal e cérebro médio, apresentando neurônios-ir nestas regiões (cabeça de seta). Notar a co-localização entre cfGnRH-cfGAP (a-d), cGnRH-II-cGAP-II (e-h), e cfGnRH-cfGAP com o anticorpo LRH<sub>13</sub> na região do hipotálamo médio basal (respectivamente, a-d e i-j). b, d, f, h, j) Regiões delimitadas respectivamente em a, c, e, g, i. **HBM**, hipotálamo médio basal; **MB**, cérebro médio. Barra: 400µm (a; c; e; g; i) e 30µm (b; d; f; h; j).

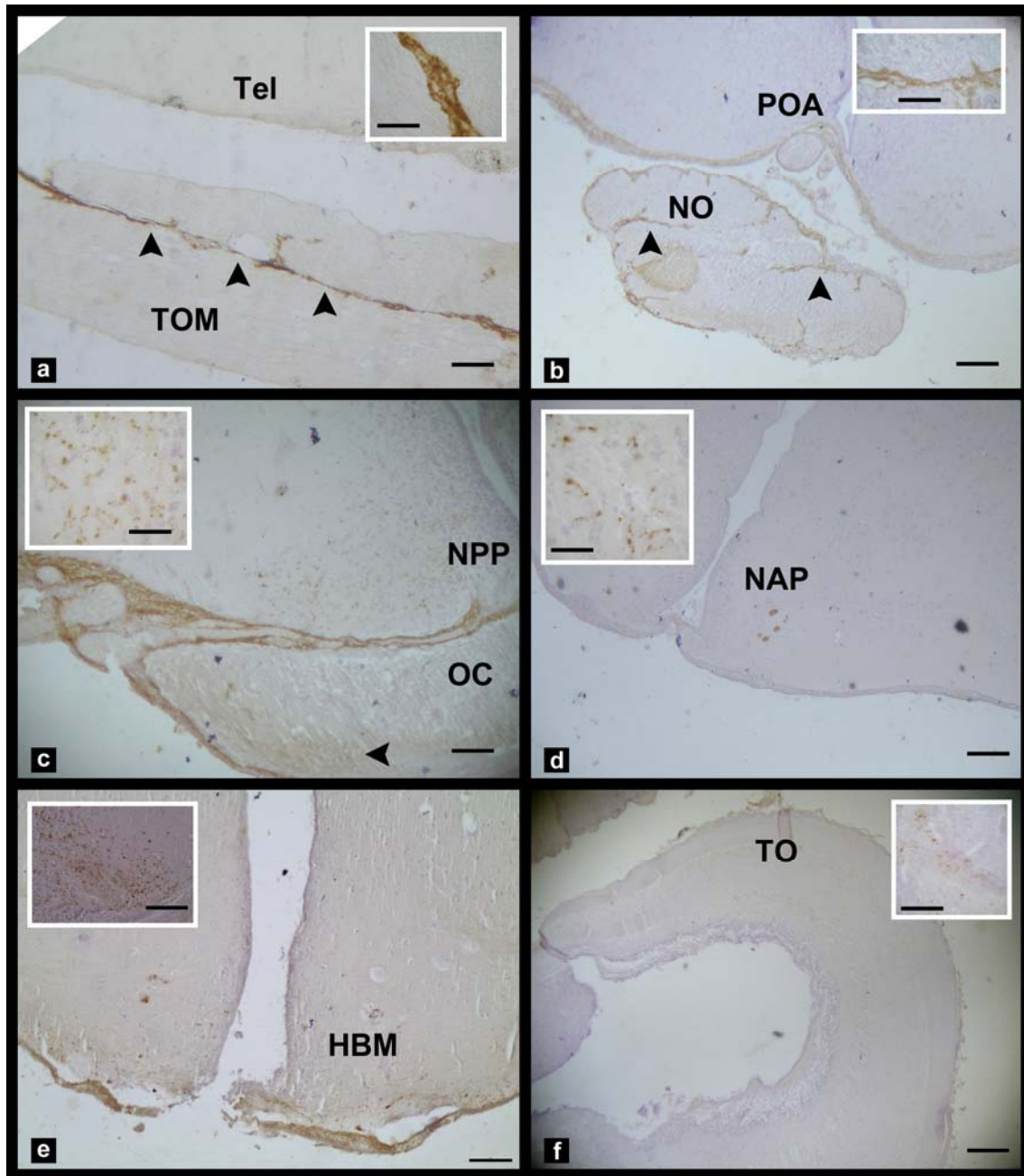




**Fig. 5.** *Steindachneridion parahybae* (exemplar no estágio de desenvolvimento gonadal: vitelogênico): Reações de imuno-histoquímicas (cfGAP e cGnRH-II), no encéfalo do surubim do Paraíba. a-c) Regiões da POA (NPP e NAP) com escassos neurônios-ir com cfGAP; d-e) Pequenos e dispersos neurônios-ir (d) distribuídos na região anterior (telencéfalo ventral) se comparados com os grandes e numerosos neurônios-ir observados posteriormente a esta região, principalmente no HBM (e). f) Reação cruzada com cGnRH-II na região HBM. Os *insets* (a-c; f) indicam os neurônios-ir observados nas regiões delimitadas (a-c; f). **NAP**, núcleo anterior periventricular; **NPP**, núcleo periventricular; **POA**, área pré-óptica; **OC**,

---

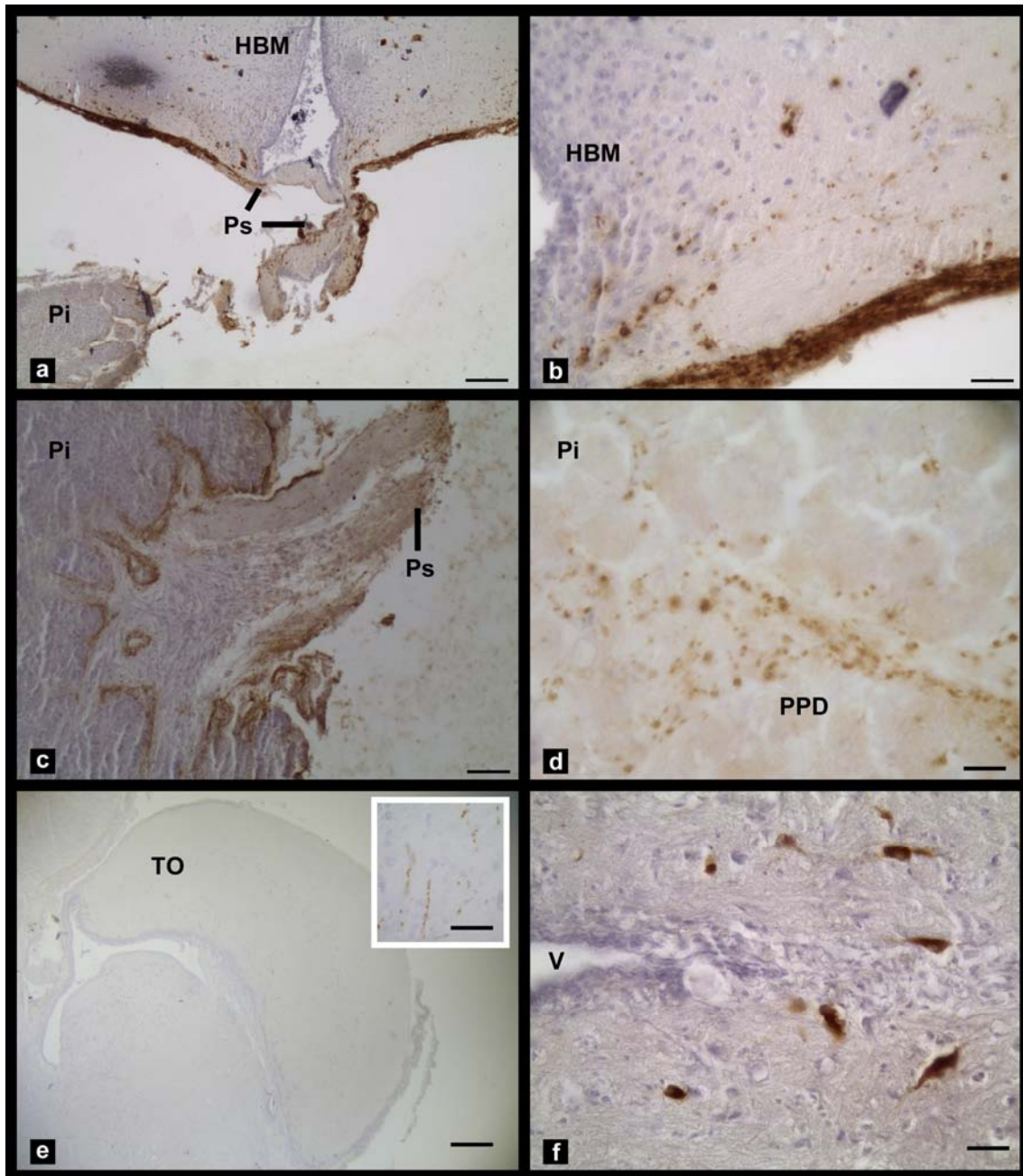
quiasma óptico. Barra: 400 $\mu\text{m}$  (a; c; f); 100 $\mu\text{m}$  (b); 30 $\mu\text{m}$  (e; *insets* em f); 10 $\mu\text{m}$  (d; *insets* em a; b; c).



**Fig. 6.** *Steindachneridion parahybae* (exemplar no estágio de desenvolvimento gonadal: vitelogênico): Reações de imuno-histoquímicas (cfGAP), no encéfalo do surubim do Paraíba. Detalhe das fibras-ir em diferentes regiões encefálicas. a) Fibras-ir (cabeça de seta) no TOM (detalhamento no *inset*); b) Fibras-ir no NO (detalhamento no *inset*); c) Fibras-ir no OC (cabeça de seta) e no NPP (detalhamento no *inset*); d) Fibras-ir no NAP (detalhamento no *inset*); e) Fibras-ir no HBM (detalhamento no *inset*); f) Fibras-ir no TO (detalhamento no *inset*). **HBM**, hipotálamo médio basal; **NAP**, núcleo anterior periventricular; **NO**, nervo olfatório; **NPP**, núcleo periventricular; **OC**, quiasma óptico; **POA**, área pré-óptica; **Tel**,

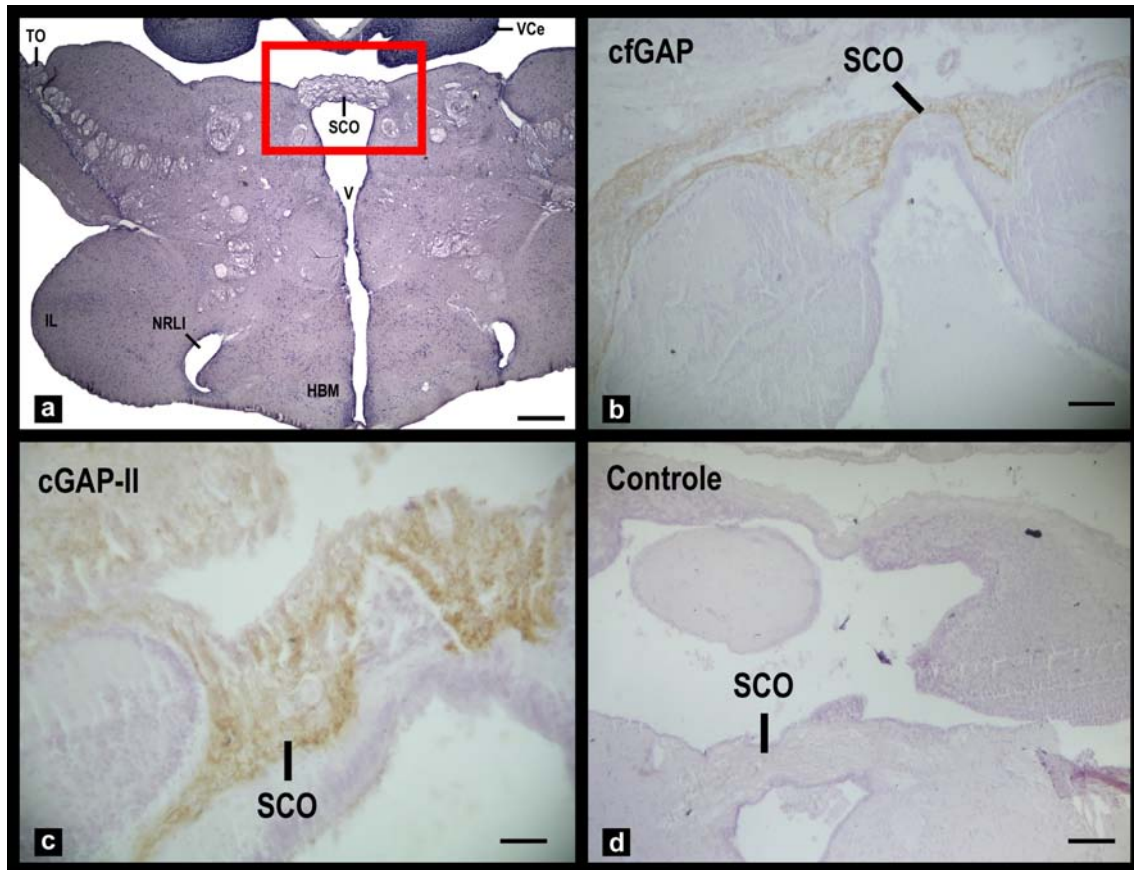
---

telencéfalo; **TO**, tecto óptico; **TOM**, trato olfatório médio. Barra: 400 $\mu$ m (a-f); 30 $\mu$ m (todos os *insets*).



**Fig. 7.** *Steindachneridion parahybae* (exemplar no estágio de desenvolvimento gonadal: vitelogênico): Reações de imuno-histoquímicas (cfGAP e cGAP-II), no encéfalo e na hipófise do surubim do Paraíba. Detalhe das fibras-ir em diferentes regiões encefálicas e na hipófise. a-d) Fibras-ir no HBM, na Pi e no PS. Detalhe das fibras-ir no HBM (b) em direção à Pi (c) pelo PS (c), principalmente na região da PPD (d); e-f) Fibras-ir no TO (detalhamento no *inset*) e próximo ao V com cGAP-II. **HBM**, hipotálamo médio basal; **Pi**, hipófise; **PPD**, proximal pars distalis; **PS**, pedúnculo hipofisário; **TO**, tecto óptico; **V**, terceiro ventrículo. Barra: 400µm (a; e); 100µm (b; c); 30µm (d; f; *inset* em e).

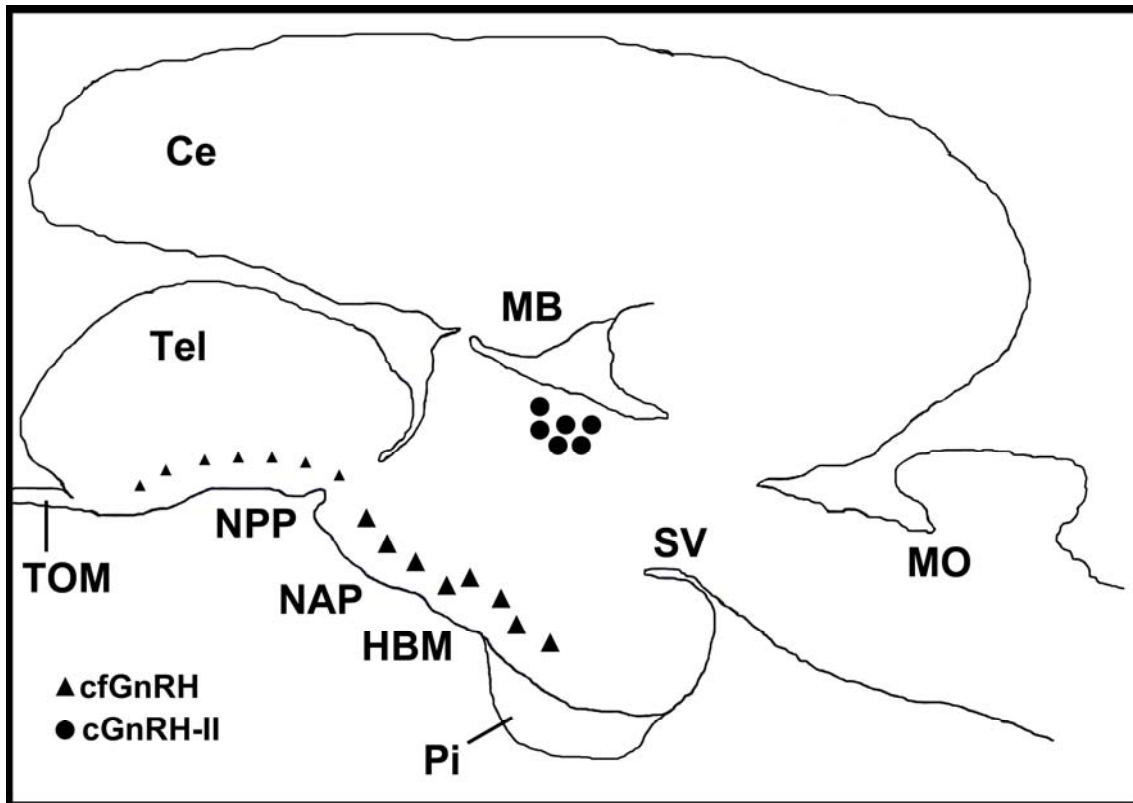




**Fig. 8.** *Steindachneridion parahybae* (exemplar no estágio de desenvolvimento gonadal: vitelogênico): Descrição de cortes histológicos no encéfalo do surubim do Paraíba, da região do órgão subcomissural e reações de imuno-histoquímicas (cfGAP e cGAP-II) e controle. a) Identificação do SCO (área delimitada). Coloração com hematoxilina ácida. b-d) Reações de imuno-histoquímicas com cfGAP (b), cGAP-II (c) e controle (d) na região do SCO. **HBM**, hipotálamo médio basal; **IL**, lobo inferior; **NRLI**, recesso lateral do núcleo lateral; **SCO**, órgão subcomissural; **TO**, tecto óptico; **V**, terceiro ventrículo; **VCe**, válvula do cerebelo. Barra: 400 $\mu$ m (a); 100 $\mu$ m (b; d); 50 $\mu$ m (c).

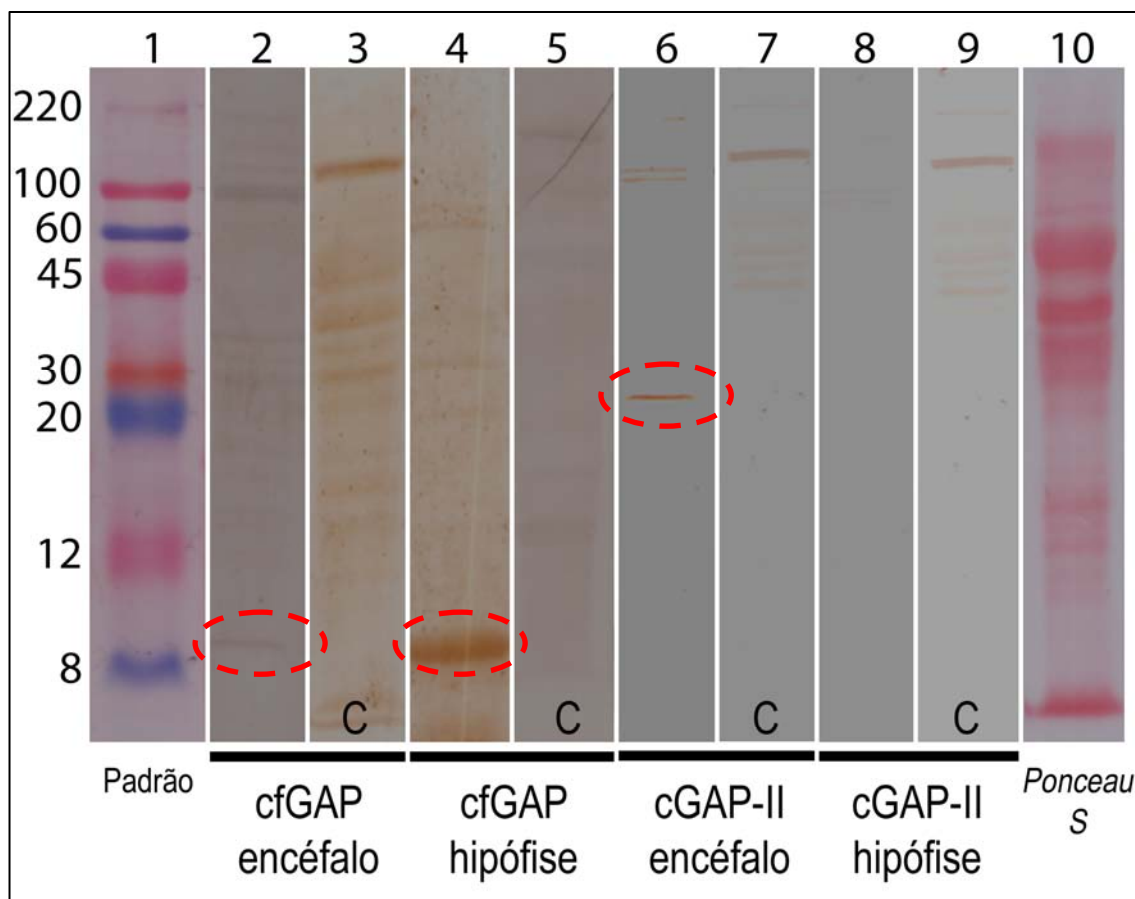






**Fig. 9.** *Steindachneridion parahybae*: Esquema de corte sagital do encéfalo do surubim do Paraíba apresentando a distribuição dos neurônios-ir de cfGAP (triângulo) e cGAP-II (círculo). **Ce**, cerebelo; **HBM**, hipotálamo médio basal; **MB**, cérebro médio; **MO**, medula oblonga; **NAP**, núcleo anterior periventricular; **NPP**, núcleo periventricular; **Pi**, hipófise; **SV**, saco vasculoso; **Tel**, telencéfalo; **TOM**, trato olfatório médio.

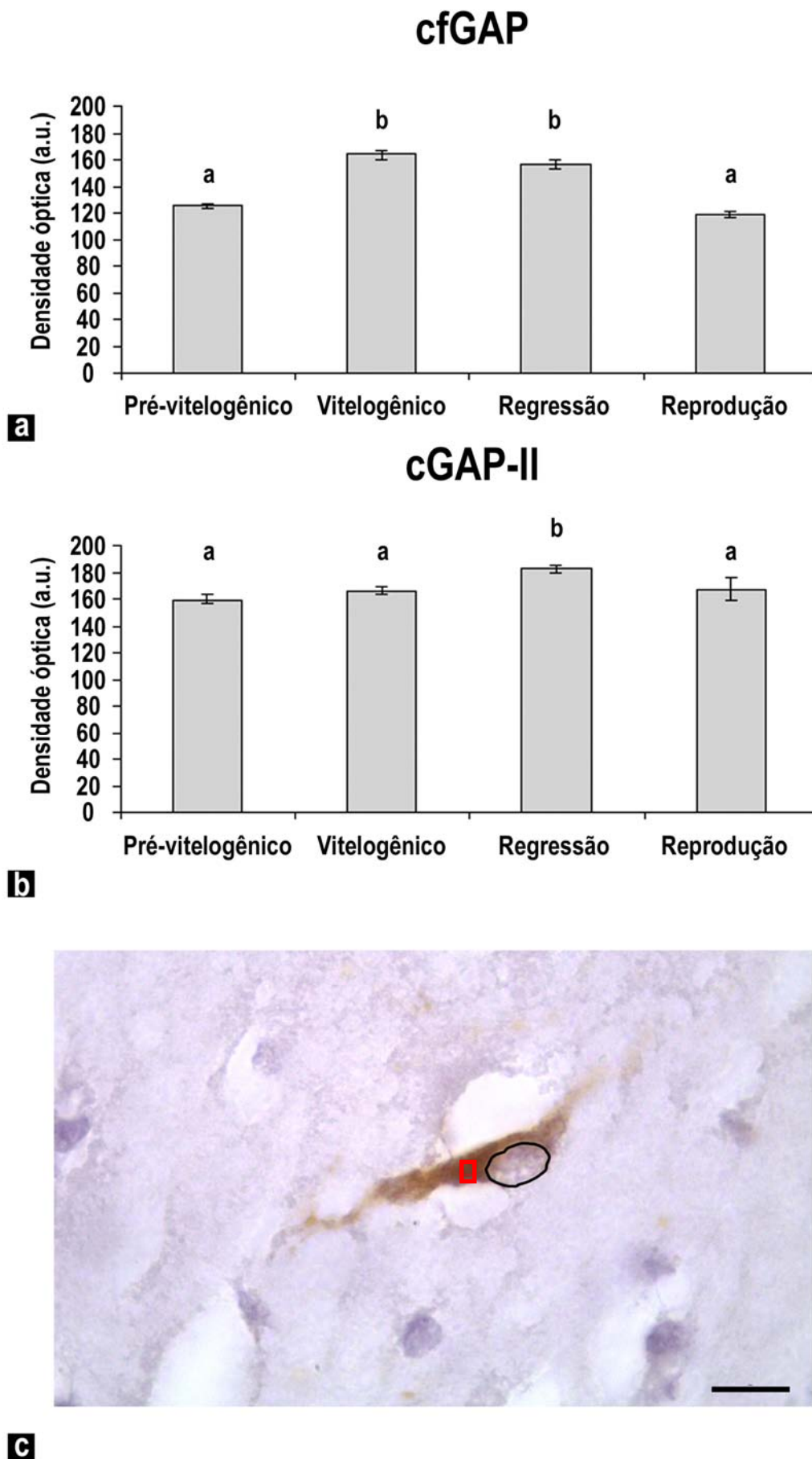




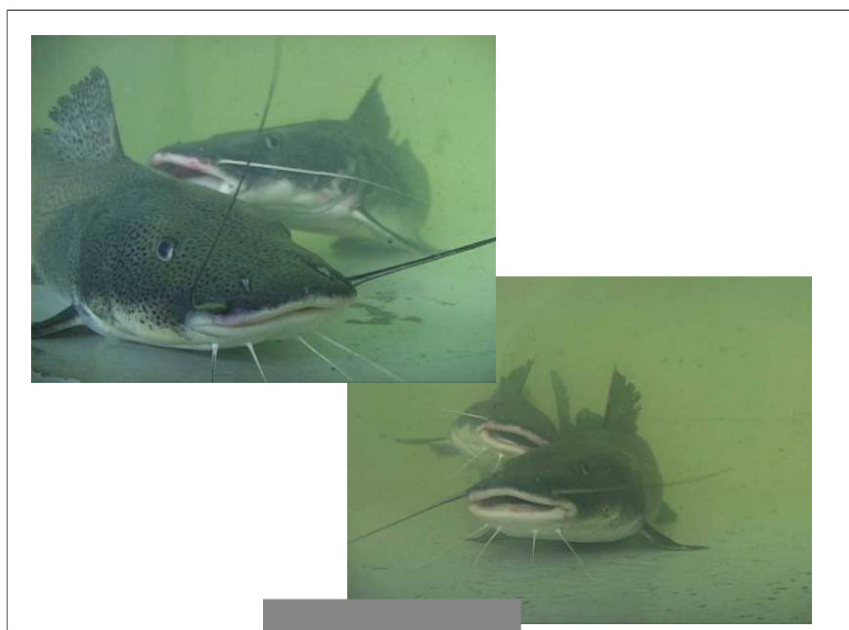
**Fig. 10.** *Steindachneridion parahybae* (exemplar no estágio de desenvolvimento gonadal: vitelogênico): Análise de *Western blot* utilizando homogeneizados de encéfalos (linhas, 2, 3, 6 e 7) e hipófises (linhas, 4, 5, 8 e 9) incubados com o anticorpo cfGAP (linhas, 2, 4), anticorpo cGAP-II (linhas, 6 e 8) e seus respectivos controles para cfGAP para encéfalos e hipófises (respectivamente, linhas, 3 e 5) e para cGAP-II para encéfalos e hipófises (respectivamente, linhas, 7 e 9). Marcador molecular padrão (linha 1). A coloração com *Ponceau S* (linha 10) foi utilizada como controle de qualidade na transferência das proteínas para a membrana no *Western blot*, e como meio alternativo para imuno-transferência, além de normalizador desta análise. C, controle.



Figura 11.



**Fig. 11.** *Steindachneridion parahybae*: Densidade óptica de neurônios-ir para cfGAP no HBM (a) e cGAP-II no MB (b) durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução. Dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. c) Fotomicrografia de neurônio-ir com cfGAP. Exemplo de medição de densidade óptica (quadrado vermelho) e área nuclear (círculo preto). Barra: 10 $\mu$ m.



Danilo Caneppele

# 5

## *CAPÍTULO*

---

Caracterização macroscópica das gônadas e reprodução induzida em cativeiro de *Steindachneridion parahybae* (Teleostei: Siluriformes), uma espécie ameaçada de extinção.

MANUSCRITO PREPARADO PARA O ENVIO:  
PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA (PAB)

Honji, R. M.; Caneppele, D. & Moreira, R. G.

**Caracterização macroscópica das gônadas e reprodução induzida em cativeiro de *Steindachneridion parahybae* (Teleostei: Siluriformes), uma espécie ameaçada de extinção.**

Honji, R. M.<sup>1</sup>; Caneppele, D.<sup>2</sup> & Moreira, R. G.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, Trav. 14, 321, 05508-900, São Paulo - SP, Brasil. \*e-mail: [renatagm@ib.usp.br](mailto:renatagm@ib.usp.br)

<sup>2</sup> – Companhia Energética de São Paulo (CESP), Unidade de Hidrobiologia e Aquicultura, Rodovia dos Tamoios, km 38. 12260-000, Brasil.

**Resumo**

O surubim do paraíba, *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) é um bagre de água doce, endêmico da Bacia do Rio Paraíba do Sul e está criticamente ameaçado de extinção. O presente estudo teve como objetivo descrever os aspectos macroscópicos das gônadas, da reprodução artificial, e da fertilização dos gametas produzidos por reprodutores de *S. parahybae*, nascidos e criados (primeira geração) em cativeiro. Apesar de ser observada a mesma localização abdominal e as características macroscópicas das gônadas de Siluriformes (i.e., testículos tem a superfície franjada com diferentes tamanhos e formas), o aspecto macroscópico dos ovários apresentou algumas anormalidades de má formação ovariana (desenvolvimento de apenas um lobo ovariano e/ou desenvolvimento ovariano não uniforme e/ou “estrangulamento” ovariano). Trinta fêmeas foram selecionadas por características externas e induzidas à reprodução artificial em cativeiro. No total, vinte e oito fêmeas responderam a indução hormonal, e a extrusão dos gametas ocorreu entre oito e dez horas após a segunda dose hormonal (com aproximadamente 200 horas-grau, 25°C). Foram liberados em média 238,80 gramas de óvulos com uma taxa de fertilização baixa, de aproximadamente  $24,33 \pm 8,35\%$ . Esta baixa produção de ovos obtidos no protocolo de reprodução induzida pode ser explicada pelas alterações morfológicas descritas nos ovários, que podem estar relacionadas à influência do cativeiro no desenvolvimento ovariano e/ou devido às características dos hormônios utilizados, evidenciando que novos estudos com diferentes preparações hormonais ainda precisam ser testados.

Palavras-chave: ovários, reprodução artificial, Rio Paraíba do Sul, surubim do Paraíba



## Abstract

The surubim do Paraíba, *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) is a freshwater catfish, endemic to the Paraíba do Sul River Basin and it is critically endangered. This study aimed to describe macroscopic aspects of the gonads, artificial reproduction, and artificial fertilization of gametes from *S. parahybae* broodstock born and raised (first generation) in captivity. Despite the observation of the same abdominal location and gonad macroscopic characteristics of Siluriformes (i.e., testes had surface fringes of different sizes and shapes), the macroscopic appearance of *S. parahybae* ovaries showed some abnormalities of ovarian malformation (development of only one lobe of ovarian and/or ovarian development is not uniform and/or ovarian “strangulation”). Thirty females were selected by external characteristics and induced to artificial reproduction in captivity. In total, twenty-eight females responded to hormonal induction, and hand-stripping of gametes occurred around eight and ten hours after the second hormone dose (approximately 200 degree-hours at 25°C). The total amount of gametes released was 238.80g with a low fertilization rate, about  $24.33 \pm 8.35\%$ . This low production of eggs obtained from the induced spawning protocol can be explained by the morphological modifications described in the ovaries that can be influenced by the captivity on ovarian development and/or due to characteristics of the hormones used, suggesting that further studies with different hormonal preparations still need to be tested.

Keywords: artificial reproduction, Paraíba do Sul River, surubim do Paraíba

## 1. Introdução

*Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae), é conhecido como surubim do Paraíba, considerada como uma espécie migradora (reofílica), endêmica da Bacia do Rio Paraíba do Sul (Garavello, 2005), e por estar na Lista Nacional das Espécies de Peixes Ameaçadas de Extinção (Caneppele *et al.*, 2008), merece atenção especial. Recentemente, esta espécie foi considerada regionalmente extinta no estado de São Paulo (Honji *et al.*, 2009a), no entanto, exemplares de *S. parahybae* eram comumente capturados em pescarias comerciais ao longo do Rio Paraíba do Sul durante a década de 1950's (Machado & Abreu, 1952), o que não ocorre mais.

Atualmente, deve-se destacar que esta Bacia merece especial atenção devido à ação antrópica causada pela instalação da Companhia Siderúrgica Nacional de Volta Redonda (RJ). Este impacto é destacado como um dos principais fatores que levaram algumas espécies endêmicas, como *S. parahybae* (Honji *et al.*, 2009a) e *Brycon insignis* (Brasil, 2004), à Lista de Espécies Ameaçadas. Adicionalmente, um desastre ecológico ocorreu no ano de 2008

(CRBio2, 2009), no qual, foi constatado o despejo de 8 mil litros de um poderoso pesticida (endosulfan), o que contaminou grande parte do Rio Pirapetinga, que deságua no rio Paraíba do Sul e conseqüentemente a mortalidade de fração importante da ictiofauna. Este fato contribui para uma ação urgente de conhecimento da biologia reprodutiva de espécies ameaçadas, para que, principalmente no caso de *S. parahybae* não corra o risco de extinção.

Como característica de peixes reofílicos migradores, estas espécies realizam migrações reprodutivas, ou seja, a migração é necessária para o desenvolvimento dos ovários e testículos, maturação dos gametas e posterior desova, sendo que, o sucesso reprodutivo em espécies migradoras fica prejudicado quando estes animais são impedidos de migrar (Mylonas *et al.*, 2010). Estes problemas ocorrem frequentemente, devido à presença de obstáculos artificiais, como as barragens, que diminui ou até mesmo impede a migração, e conseqüentemente a reprodução, ou ainda, no confinamento em viveiros de cultivo (pisciculturas). Além disso, a baixa produção de ovos observada durante a indução artificial de *S. parahybae* (Caneppele *et al.*, 2009), se comparado com outras espécies de Siluriformes (Baldisserotto & Neto, 2005; Campos, 2005), sugerem um estudo específico nos ovários durante o período reprodutivo, para que, posteriormente, possa ser investigada a produção de larvas desta espécie, o que permitirá o estabelecimento de um programa adequado de repovoamento, bem como, uma investigação de seu potencial para a aquicultura nacional.

Em 2003, a Companhia Energética de São Paulo (CESP), incluiu *S. parahybae* no programa de conservação da CESP, sendo que, um dos principais objetivos deste estudo é fornecer dados biológicos para o Programa de Repovoamento de Peixes da Bacia do Rio Paraíba do Sul (Caneppele *et al.*, 2009). Adicionalmente, a reprodução artificial com elevado sucesso na fertilização (nem sempre possível em programas de repovoamento) é uma das ações imediatas para ajudar a conservação das espécies ameaçadas de extinção. Desta forma, objetivou-se a analisar e descrever os aspectos macroscópicos das gônadas de *S. parahybae*, durante o processo de reprodução induzida de reprodutores nascidos e criados em cativeiro.

## 2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Piscicultura da Companhia Energética de São Paulo (CESP) (23° 24' 53,71'' S e 45° 35' 59,82'' W), localizada no município de Paraibuna (São Paulo, Brasil). Em dezembro de 2003, reprodutores de *S. parahybae* de origem selvagem foram induzidos a reprodução artificial em cativeiro (Caneppele *et al.*, 2009), e todos os animais produzidos (7.800 alevinos) foram estocados nesta piscicultura da CESP para formação de futuros reprodutores de origem de cativeiro (primeira geração, F1). Estes animais (F1) foram

mantidos (2003 – 2009) em viveiros de 200 m<sup>2</sup> (10 X 20m), e durante este período foram alimentados diariamente “*ad libitum*” com ração comercial extrusada para carnívoros, com teor de proteína bruta de 40% e granulometria de 6 mm de diâmetro (Purina TC 40). Um maior detalhamento da captura dos reprodutores selvagens e do protocolo de indução hormonal de *S. parahybae* foram descritos em Caneppele *et al.*, (2009).

No início do ano de 2009, estes animais (F1) foram induzidos artificialmente à reprodução na piscicultura da CESP, levando-se em consideração o protocolo descrito para *S. parahybae* (Caneppele *et al.*, 2009) (Fig. 1). Rapidamente, os animais aptos à reprodução foram selecionados no próprio viveiro, observando-se as seguintes características: para as fêmeas, foram selecionados os animais que apresentavam o abdome abaulado e a papila urogenital saliente e avermelhada (Fig. 2a). Adicionalmente, foi realizada uma leve pressão no abdome das fêmeas para verificar a liberação dos oócitos. Para a seleção dos machos, priorizaram-se os animais que liberavam sêmen quando eram levemente pressionados na região abdominal. Posteriormente, os animais selecionados foram transferidos para os tanques no laboratório (150 cm X 85 cm X 45 cm), com aproximadamente 575 litros, e foi aplicado o protocolo estabelecido para *S. parahybae*.

No total, 30 fêmeas (F1) foram utilizadas na indução artificial a reprodução, sendo que, 15 fêmeas foram utilizadas na primeira indução hormonal (04/02/2009), e 15 fêmeas na segunda indução (09/02/2009). Para a indução da desova, foram utilizadas duas injeções intraperitoniais de extrato hipofisário de carpa (cPE) (*Fish Braz*), dissolvidos em 0,9% de solução de cloreto de sódio em cada dose (as especificações das doses de cada experimento são apresentadas respectivamente nas Tabelas 1 e 2). É importante salientar, que na segunda dose de cPE (intervalo entre as doses foi de 12 horas), foi administrada também uma dose de gonadotropina coriônica humana (Pregnyl – Organon) com concentrações especificadas nas Tabelas 1 e 2 (von Ihering & Azevedo, 1936; Harvey & Carolsfeld, 1993). No momento em que as fêmeas receberam a segunda dosagem hormonal, os machos receberam uma dose única de 3 mg/kg de cPE. Foram utilizados 2 machos de origem selvagem (Tabelas 1 e 2) em cada experimento de indução hormonal.

Após a ovulação, os gametas foram extrusados manualmente e a fertilização foi realizada a “seco” (von Ihering & Azevedo, 1934, 1936). A seguir, os ovos foram transferidos para incubadoras cônicas de 200 litros. A taxa de fertilização foi calculada 6 horas após a transferência dos ovos para as incubadoras cônicas ( $F = (\text{número de ovos fertilizados} \times 100) / \text{número total de ovos}$ ) (Vazzoler, 1996). A temperatura da água e a concentração de oxigênio foram monitoradas durante a indução hormonal, desde a primeira dose hormonal até o oitavo

dia após a desova dos animais. A verificação da temperatura é um dado importante para posteriormente ser calculado o índice “hora-grau” (HG) ou “unidade térmica acumulada”, o qual indica o período exato para se realizar a extrusão dos gametas dos animais induzidos (Caneppele *et al.*, 2009). Após a absorção macroscópica do saco vitelínico, as larvas foram alimentadas com larvas de lambari (*Astyanax altiparanae*) e posteriormente com larvas de curimatã (*Prochilodus lineatus*). Logo em seguida, as larvas foram transferidas para os viveiros de criação para o treinamento com ração comercial.

Adicionalmente, para a caracterização macroscópica das gônadas de *S. parahybae* em cativeiro, foram sacrificados três machos e cinco fêmeas antes da indução à reprodução, e todos os reprodutores induzidos artificialmente após a extrusão. Estes animais foram anestesiados (1,0g de benzocaína, diluída em 100 ml de álcool 92,6° GL, adicionada em 20L de água), e sacrificados para a observação e descrição macroscópica das gônadas. É importante salientar que todos os procedimentos adotados no presente estudo, para sacrificar os animais, estão de acordo com o Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolo 072/2008).

### 3. Resultados e Discussão

Os parâmetros físico-químicos, como por exemplo, temperatura, pH e oxigênio dissolvido, são parâmetros que podem influenciar na biologia reprodutiva dos animais (Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007), portanto, esses parâmetros de qualidade de água foram acompanhados neste experimento, e se mostraram próximos aos valores adequados observados para outros peixes neotropicais (principalmente para as espécies da ordem Siluriformes), como por exemplo, para o *Pimelodus maculatus* (Weingartner & Zaniboni-Filho, 2004), *Rhamdia quelen* (Baldisserotto & Neto, 2005), *Pseudoplatystoma fasciatum* (Leonardo *et al.*, 2004) e, inclusive para o mesmo gênero do surubim do Paraíba, como o *S. scripta* (Adamante *et al.*, 2007), para o *S. scriptum* (Schütz *et al.*, 2008), e para o *S. melanodermatum* (Feiden *et al.*, 2006). Desta forma, os parâmetros físico-químicos monitorados ao longo do experimento não mostraram variações que possam ter influenciado na reprodução do surubim do Paraíba, pois como apresentado, estes parâmetros estão dentro da faixa de conforto para as espécies neotropicais, inclusive para o mesmo gênero *Steindachneridion*.

Os ovários de *S. parahybae* são órgãos pares, alongados com a extremidade anterior terminando em fundo cego, e as extremidades posteriores unidas através de um ducto que alcança o poro genital. Os ovários localizam-se na cavidade abdominal, ventralmente aos rins e à vesícula gasosa e dorsalmente ao tubo digestório, e são ligados à parede dorsal do celoma

pelo mesentério (Fig. 2b). Estas características anatômicas estudadas em *S. parahybae*, correspondem à maioria das características relatadas para outras espécies de Siluriformes (Romagosa *et al.*, 2003; Leonardo *et al.*, 2004).

Os oócitos liberados durante a seleção dos reprodutores para a reprodução artificial apresentavam-se coloração amarelados, não adesivos e com média de diâmetro de  $1,10 \pm 0,10$  mm (detalhe na Fig. 2a), dados também semelhantes a outras espécies de Siluriformes (Leonardo *et al.*, 2004; Campos, 2005; Baldisserotto & Neto, 2005).

Os testículos (Fig. 2c), também são órgãos pares, localizados na mesma posição dos ovários na cavidade abdominal e, apresentam um padrão anatômico característico da maioria dos Siluriformes, ou seja, a superfície deste órgão apresenta “franjas” de diferentes tamanhos e formas em toda a superfície, e que variam de acordo com o ciclo reprodutivo (Batlouni *et al.*, 2006). Morfologia esta, diferente das outras ordens de teleósteos neotropicais que apresentam superfície lisa ao longo do desenvolvimento testicular.

Uma característica macroscópica observada nos ovários de *S. parahybae*, é que em alguns exemplares o desenvolvimento dos lobos dos ovários não é uniforme (detalhamento desta diferença no comprimento ovariano na Fig. 2d), ou seja, um dos lobos do ovário se desenvolve mais que o outro (não foi observado nenhum padrão com relação ao lobo menos desenvolvido, ser do lado direito ou esquerdo). Além disso, em alguns animais foi observado também que um dos lobos do ovário apresentou uma má formação (“afunilamento” ovariano detalhado na Fig. 2e) ao longo do comprimento total, e outros animais apresentaram o desenvolvimento de apenas um lobo do ovário (Fig. 2f). Estas alterações morfológicas sugerem uma hipótese, de que estas alterações macroscópicas observadas nos ovários de *S. parahybae* possam estar relacionadas à manutenção no cativeiro, no entanto, a indisponibilidade de animais selvagens, devido ao estágio ameaçado de extinção da espécie (Honji *et al.*, 2009a), dificulta a comprovação desta hipótese.

Considerando-se apenas as fêmeas, as características externas dos reprodutores, como por exemplo, o abdome abaulado e papila urogenital saliente e avermelhada, foram critérios importantes para a seleção destas fêmeas aptas à indução hormonal. Adicionalmente, uma leve pressão no abdome das fêmeas para verificar a liberação dos oócitos, também é um importante critério para verificar a condição dos reprodutores, pois, esta pequena quantidade de oócitos pode indicar um melhor diagnóstico do tamanho dos oócitos, aparência e principalmente a homogeneidade do diâmetro destes gametas (Harvey & Carolsfeld, 1993; Honji *et al.*, 2009b, 2011). Além disso, o número reduzido de fêmeas de *S. parahybae* disponíveis no presente trabalho é uma situação comum encontradas em pisciculturas com

enfoque em conservação, sendo reflexo das dificuldades na obtenção de um número adequado de reprodutores devido à redução da população desta espécie (Honji *et al.*, 2009a).

A Tabela 1 sumariza os dados da primeira tentativa de indução realizada com os animais nascidos e criados em cativeiro (primeira geração – F1). A extrusão a seco ocorreu em torno de oito horas após a segunda dose hormonal (ou com aproximadamente 200 horas-grau, temperatura média de 25°C). Próximo às 200 HG, um aumento da atividade dos animais foi observado, incluindo um comportamento agressivo dos reprodutores, indicando o momento da extrusão. Este valor de HG foi similar ao observado para outras espécies da ordem Siluriformes, como por exemplo, *S. melanodermatum* (Ludwig *et al.*, 2005), *Pseudoplatystoma corruscans* (Campos, 2005) e *R. quelen* (Baldisserotto & Neto, 2005).

Na primeira indução hormonal de *S. parahybae* (Tabela 1) foram selecionadas 15 fêmeas, das quais, 14 responderam positivamente à indução hormonal, entretanto, a quantidade de oócitos liberados por fêmeas, e a quantidade total final de oócitos liberados (156,80 gramas), foi muito baixa, se comparado a outras espécies de Siluriformes, como por exemplo, *P. corruscans* (Campos, 2005). A única fêmea que não respondeu a indução apresentou uma formação ovariana irregular (Fig. 3a), ou seja, com os lobos ovarianos subdivididos, afunilamento próximo à papila urogenital, além de um pequeno desenvolvimento se comparado a outros animais do mesmo lote que apresentaram o desenvolvimento regular (Fig. 2b). Adicionalmente, após a primeira dose hormonal, os animais foram acondicionados em viveiros no laboratório, porém, mantendo-se duas fêmeas por viveiros foi observado um comportamento agressivo, o que ocasionou feridas e posteriormente uma infecção das áreas afetadas (Figs. 3b, c). Outra observação comportamental, é que uma fêmea pode ser considerada dominante e a outra é subordinada, pois apenas uma das fêmeas apresentou ferimentos nas áreas afetadas quando acondicionadas duas fêmeas por tanque. Neste caso, não é recomendado o acondicionamento dos reprodutores durante a indução hormonal em um mesmo viveiro, devido ao comportamento agressivo dos reprodutores, que já havia sido constatado por Caneppele *et al.*, (2009).

Na segunda reprodução artificial (Tabela 2) foram selecionadas 15 fêmeas e apenas 14 animais responderam positivamente à indução hormonal. A fêmea que não respondeu a indução hormonal apresentou o mesmo problema relatado anteriormente, ou seja, o exemplar não respondeu à indução hormonal provavelmente devido à formação irregular ovariana e um afunilamento na porção posterior do ovário (Fig. 3d). Adicionalmente, a quantidade de oócitos liberados foi ainda inferior à primeira indução hormonal (Tabela 2). Neste caso, foram liberadas 82,00 gramas de oócitos, sendo que, a diferença de tempo entre as duas reproduções

artificiais foi de apenas uma semana. Além disso, o uso combinado de cPE e hCG, utilizado no presente estudo e em várias espécies de “catfish” indicou ser uma estratégia bem sucedida e consistente para este grupo de teleósteos (Leonardo *et al.*, 2004; Campos, 2005; Mylonas *et al.*, 2010). Neste caso, estudos adicionais variando as doses hormonais e testando outros hormônios na reprodução artificial (como por exemplo, análogo de hormônio liberador de gonadotropinas, GnRH-a), precisam ser realizados em *S. parahybae*. Nesta segunda reprodução não ocorreu o comportamento agressivo, pois todos os animais foram mantidos separados em cada viveiro.

Devido ao comportamento agressivo de *S. parahybae* observado durante a indução hormonal, optou-se pela extrusão dos gametas seguida pela fertilização a seco dos gametas, no entanto, pôde-se observar que a quantidade de oócitos extrusados do surubim do Paraíba é inferior a espécie congênica *S. melanodermatum* (Ludwig *et al.*, 2005), e apresentou uma taxa de fertilização de apenas  $24,33 \pm 8,35\%$ . Adicionalmente, pode-se observar que ao serem extrusadas, as fêmeas não liberaram todos os oócitos, pois a maioria dos animais sacrificados após a indução hormonal apresentavam os ovários ainda desenvolvidos e com zonas hemorrágicas (Fig. 3e). Uma análise histológica dos ovários de *S. parahybae* poderá responder outras questões referentes ao desenvolvimento ovariano.

A indução hormonal e o procedimento de extrusão manual dos oócitos e espermatozoides podem causar impactos negativos à qualidade dos gametas (Bobe & Labbé, 2010), o que poderia ter influenciado a baixa taxa de fertilização (primeira e segunda indução hormonal), como sugerido para outras espécies de teleósteos (Mylonas *et al.*, 2010). Além do mais, a extrusão manual dos gametas é acompanhada de grandes danos causados nos órgãos abdominais dos reprodutores, e ao analisar o aspecto macroscópico dos ovários destas fêmeas (comparando a primeira e a segunda reprodução artificial), pode-se observar que muitos oócitos pareciam estar em atresia, devido à aparência macroscópica (Fig. 3f) e vários oócitos aoesentaram coloração esbranquiçada (detalhe na Fig. 3f). Esta característica de oócitos atrésicos apresentados pelos ovários de *S. parahybae* também foi observada em outros Siluriformes, como por exemplo, *P. fasciatum* (Leonardo *et al.*, 2006), sugerindo também, que a absorção dos oócitos do surubim do Paraíba é um processo rápido, e que futuramente será investigado pelo nosso grupo de pesquisa.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a baixa produção de ovos obtidos no protocolo de reprodução induzida do surubim do Paraíba pode ser explicada pelas alterações morfológicas dos ovários aqui apresentadas. Estas alterações podem estar relacionadas à influência do cativeiro no desenvolvimento ovariano e/ou devido às

características dos hormônios utilizados (hipófise e hCG), evidenciando que novos estudos com diferentes preparações hormonais ainda precisam ser testados. Além disso, estudos adicionais, em relação à genética dos reprodutores, metabolismo, larvicultura, entre outros, são necessários para se obter uma base regular para o estabelecimento de um programa adequado de repovoamento desta espécie na Bacia do Paraíba do Sul e tributários. Estes resultados também servem para reforçar a necessidade de se estudar o ciclo reprodutivo desta espécie em cativeiro, e também podem ser incorporados na conservação e reabilitação de *S. parahybae* em áreas impactadas.

#### 4. Agradecimentos

Agradecemos à Piscicultura da Companhia Energética de São Paulo (CESP) e seus funcionários pelo apoio técnico e manutenção dos reprodutores nos tanques, e à FAPESP (Processos: 2007/55949-7 e 2008/57687-0) pelo suporte financeiro do projeto.

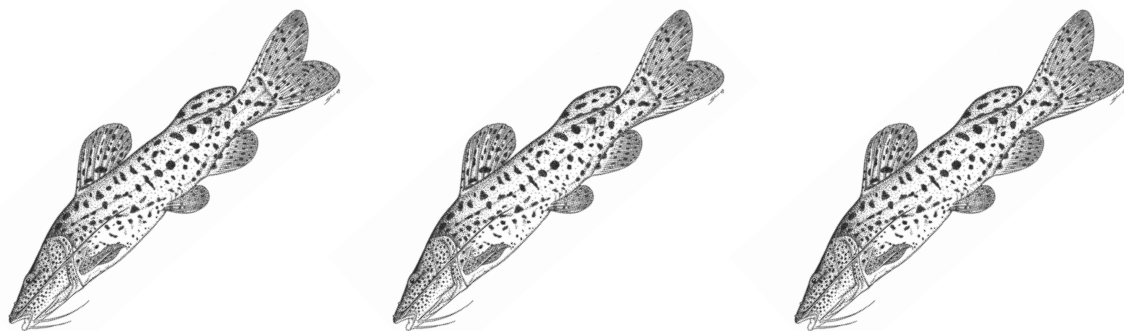
#### 5. Referências bibliográficas

- Adamante, W.B.; Weingartner, M. & Nuñez, A.P.O. (2007). Feed transition in larval rearing of bocudo, *Steindachneridion scripta* (Pisces, Pimelodidae), using *Artemia* spp. Nauplii and artificial diet. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(5): 1294-1300.
- Baldisserotto, B. & Neto, J.R. (2005). Jundiá (*Rhamdia* sp.). In: Baldisserotto, B. & Gomes, L.C. Espécies Nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria, Rio Grande do Sul. Ed. UFSM.
- Batlouni, S.R.; Romagosa, E. & Borella, M.I. (2006). The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction Science*, 96: 116-132.
- Bobe, J. & Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 535-548.
- Brasil. (2004). Instrução normativa N° 05 de 21 de maio de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Ministério do Meio Ambiente.
- Campos, J.L. (2005). O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Spix e Agassiz, 1829). In: Baldisserotto, B. & Gomes L.C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Ed. UFSM. 1ª edição. Rio Grande do Sul.

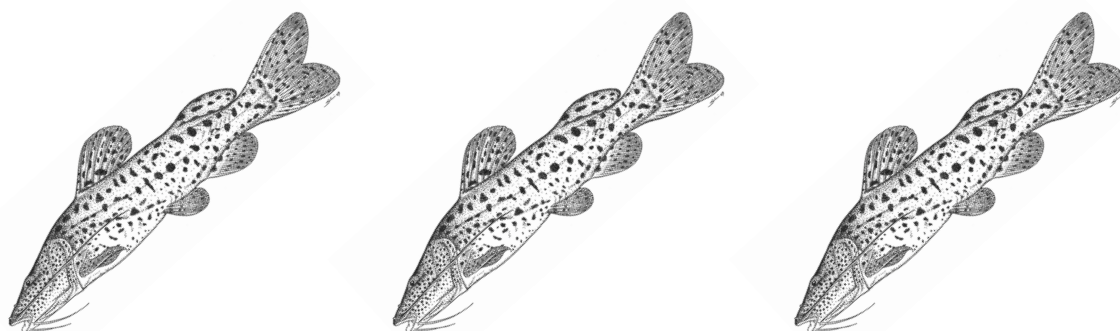


- Caneppele D.; Pompeu, P. & Garavello, J. (2008). *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1876). In: Machado, A.B.M.; Drummond, G.M. & Paglia, A.P. Livro vermelho da fauna Brasileira ameaçada de extinção. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Departamento de Conservação da Biodiversidade. Brasília, DF.
- Caneppele, D.; Honji, R.M.; Hilsdorf, A.W. & Moreira, R.G. (2009). Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, 7(4): 759–762.
- CRBio2. (2009). Rio Paraíba do Sul pede socorro. Disponível em : <<http://portal.crbio-02.gov.br/Informativo/Mar09.pdf>>. Acessado em : 28 set. 2009.
- Feiden, A.; Hayashi, C. & Boscolo, W.R. (2006). Desenvolvimento de larvas de surubim-do-iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) submetidas a diferentes dietas. *Revista Brasileira de Zoologia*, 35(6): 2203-2210.
- Garavello, J.C. (2005). Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, 3(4): 607–623.
- Harvey, B. & Carolsfeld, J. (1993). Induced breeding in tropical fish culture. International Development Research Centre. Ottawa, Canada.
- Honji, R.M.; Caneppele, D.; Hilsdorf, A.W.S. & Moreira, R. G. (2009a). Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). *Environmental Biology of Fishes*, 85(3): 207-208.
- Honji, R.M.; Mello, P.H.; Araújo, B.C.; Rodrigues-Filho, J.A.; Hilsdorf, A.W.S. & Moreira, R.G. (2011). Influence of spawning procedure on gametes fertilization success in *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae): implications for the conservation of this species. *Neotropical Ichthyology*, 9(2): 363-370.
- Honji, R.M.; Narcizo, A.M.; Borella, M.I.; Romagosa, E. & Moreira, R.G. (2009b). Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 109–123.
- von Ihering, R. & Azevedo, P. (1934). A curimatã dos açudes nordestinos (*Prochilodus argenteus*). *Arquivos do Instituto Biológico*, 5(5): 43-184.
- von Ihering, R. & P. Azevedo. (1936). A desova e a hipofiseação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. *Arquivos do Instituto Biológico*, 7(9): 107-180.
- Leonardo, A.F.G.; Romagosa, E.; Batlouni, S.R. & Borella, M.I. (2006). Occurrence and significance of ovarian and follicular regression in cachara *Pseudoplatystoma*

- fasciatum* (Linnaeus, 1766): a histology approach. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58(5): 831–840.
- Leonardo, A.F.G.; Romagosa, E.; Borella, M.I. & Batlouni, S.R. (2004). Induced spawning of hatchery-raised brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). *Aquaculture*, 240: 451-461.
- Ludwig, L.A.M.; Gomes, E. & Artoni, R.F. (2005). Um método de reprodução induzida para o surubim *Steindachneridion melanodermatum* (Siluriformes, Pimelodidae) do Rio Iguçu. *Ciências Biológicas e da Saúde de Ponta Grossa*, 11(3/4) 23-27.
- Machado, C. E. & Abreu, H.C.F. (1952). Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo-1. A pesca no Vale do Paraíba. *Boletim da Indústria Animal de São Paulo*, 13: 145-160.
- Mylonas, C.C.; Fostier, A. & Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 516-534.
- Romagosa, E.; Paiva, P.; Andrade-Talmelli, E.F. & Godinho, H. M. (2003). Biologia reprodutiva de fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae), mantidas em cativeiro. *Boletim do Instituto de Pesca*, 29: 151-159.
- Schütz, J.H.; Weingartner, M.; Zaniboni-Filho, E. & Nuñez, A.P.O. (2008). Crescimento e sobrevivência de larvas de suruvi *Steindachneridion scriptum* nos primeiros dias de vida: influência de diferentes alimentos e fotoperíodos. *Boletim do Instituto de Pesca*, 34(3): 443-451.
- Vazzoler, A.E.A.M. (1996). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. EDUEM, Maringá.
- Weingartner, M. & Zaniboni-Filho, E. (2004). Efeito de fatores abióticos na larvicultura de pintado amarelo *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803): salinidade e cor de tanque. *Acta Scientiarum*, 26(2): 151-157.
- Zaniboni Filho E. & Weingartner M. (2007). Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31(3): 367-373.



**TABELAS: CAPÍTULO 5**





**Tabela 1.** *Steindachneridion parahybae*. Dados biométricos e ponderais dos reprodutores (F1) e protocolo da primeira indução hormonal do surubim do Paraíba induzidos à reprodução artificial (Data: 04/02/2009). Dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

Reprodutores (primeira indução)	N	Média $\pm$ EPM	Primeira dose cPE (mg/kg)	Segunda dose cPE (mg/kg)	hCG (UI/kg)	Oócitos liberados (g)
Fêmeas						
massa corpórea total (g)	15	562,33 $\pm$ 11,98	4,50	45,00	2	156,8
Comprimento padrão (cm)	15	33,16 $\pm$ 0,23				
Machos						
massa corpórea total (g)	2	1650,00 $\pm$ 150,00	3mg/Kg de cPE (dose única)			
comprimento padrão (cm)	2	41,75 $\pm$ 1,75				
Temperatura da água (°C) e oxigênio dissolvido (mg/L)		Primeira dose	24,6°C e 7,74 mg/L			
		Segunda dose	23,9°C e 8,14 mg/L			
		Extrusão dos gametas (200 HG)	25,0°C e 8,20 mg/L			
		Média anual	21,33 $\pm$ 0,38°C e 7,58 $\pm$ 0,36 mg/L			

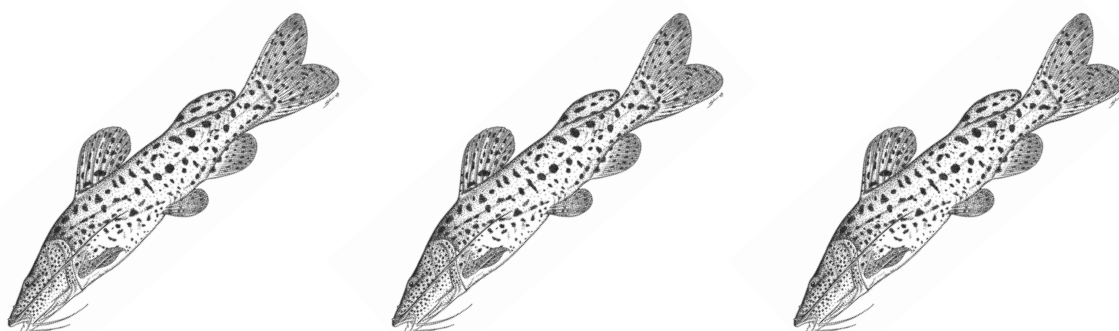
**Tabela 2.** *Steindachneridion parahybae*. Dados biométricos e ponderais dos reprodutores (F1) e protocolo da segunda indução hormonal do surubim do Paraíba induzidos à reprodução artificial (Data: 09/02/2009). Dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

Reprodutores (primeira indução)	N	Média $\pm$ EPM	Primeira dose cPE (mg/kg)	Segunda dose cPE (mg/kg)	hCG (UI/kg)	Oócitos liberados (g)
Fêmeas						
massa corpórea total (g)	15	548,93 $\pm$ 23,28	4,45	44,50	1,5	82,00
comprimento padrão (cm)	15	33,51 $\pm$ 0,44				
Machos						
massa corpórea total (g)	2	1450,00 $\pm$ 350,00	3mg/Kg de cPE (dose única)			
comprimento padrão (cm)	2	42,50 $\pm$ 2,50				
Temperatura da água (°C) e oxigênio dissolvido (mg/L)		Primeira dose	23,0°C e 8,70 mg/L			
		Segunda dose	22,6°C e 7,28 mg/L			
		Extrusão dos gametas (200 HG)	23,4°C e 7,64 mg/L			
		Média anual	21,33 $\pm$ 0,38°C e 7,87 $\pm$ 0,42 mg/L			



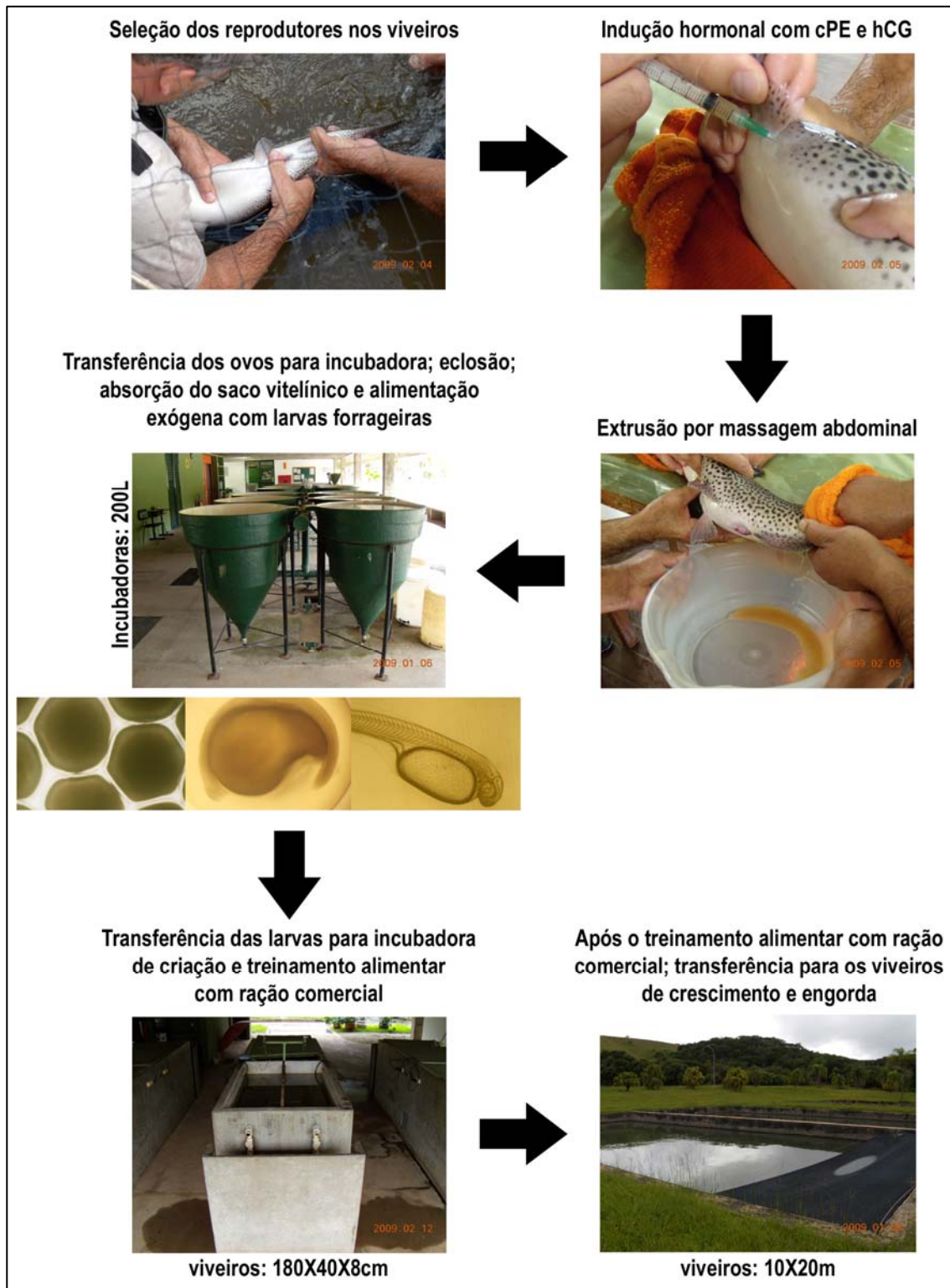


**FIGURAS: CAPÍTULO 5**



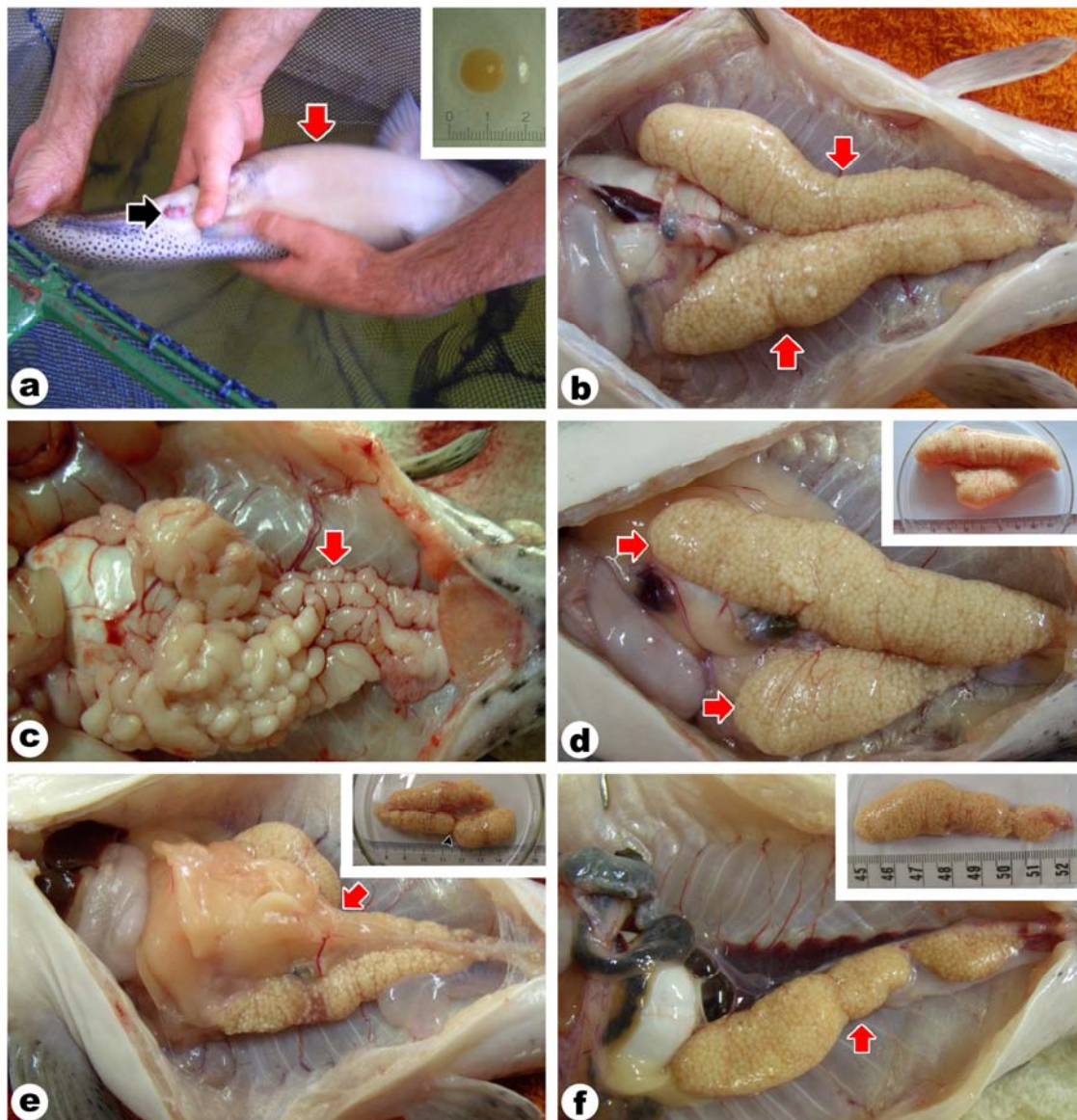






**Fig. 1:** *Steindachneridion parahybae*. Representação esquemática do protocolo de indução artificial do surubim do Paraíba na CESP.

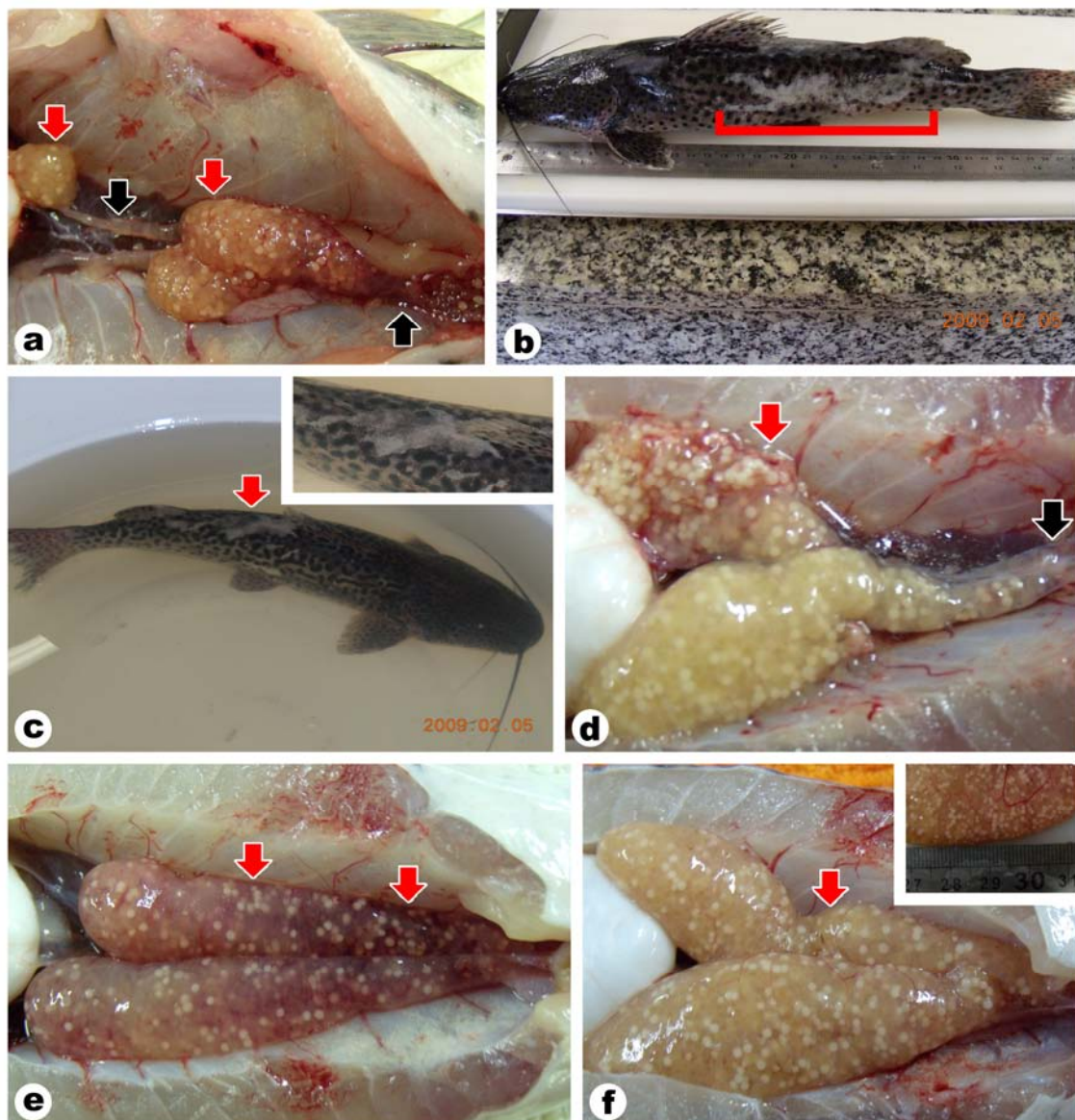




**Fig. 2:** *Steindachneridion parahybae*. a) Detalhe da papila genital avermelhada (seta negra) e abdômen abaulado (seta vermelha) de uma fêmea de surubim do Paraíba. Detalhe superior: oócito fertilizado; b) Característica de um ovário em maturação avançada (seta vermelha), com o desenvolvimento dos lobos com tamanho uniforme; c) Característica de um testículo “franjado” (seta vermelha) do surubim do Paraíba, característico de Siluriformes; d) Característica de um ovário com maturação avançada (seta vermelha), entretanto, com desenvolvimento diferenciado no comprimento dos lobos ovarianos (detalhe superior do desenvolvimento ovariano não uniforme); e) Característica de outra má formação (seta vermelha) observada no ovário do surubim do Paraíba; obstrução em um dos lobos (detalhe

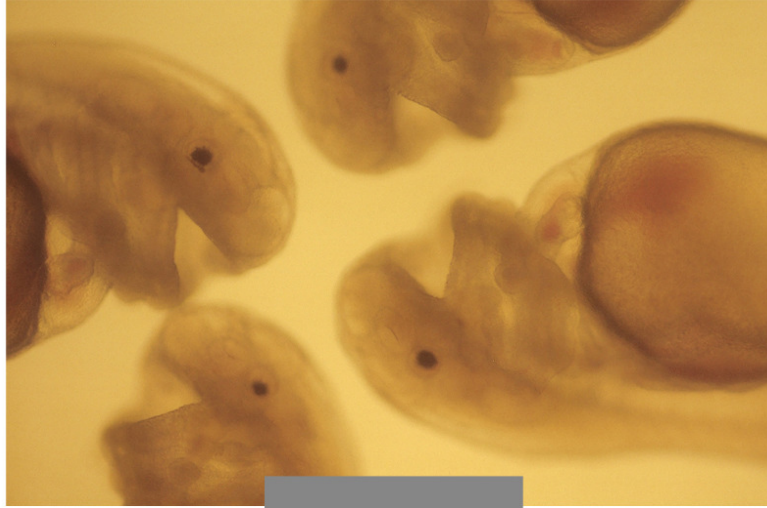
---

superior); f) Característica do desenvolvimento de apenas um lobo ovariano (seta vermelha) no surubim do Paraíba (detalhe superior do desenvolvimento diferenciado).



**Fig. 3:** *Steindachneridion parahybae*. a) Fêmea de surubim do Paraíba induzida à desova artificial (primeira reprodução), que não respondeu positivamente à indução hormonal e apresentou uma má formação ovariana (seta vermelha), além de um afunilamento dos lobos ovarianos (seta negra) no decorrer do desenvolvimento ovariano e na região próxima à papila genital; b, c) Injúrias decorrentes do comportamento agressivo dos reprodutores e áreas afetadas (área vermelha na região lateral (b) e dorsal (seta vermelha) e no detalhe no canto superior (c)); d) Fêmea de surubim do Paraíba induzida à reprodução artificial (segunda reprodução), que não respondeu positivamente à indução hormonal; e também apresentou uma formação ovariana irregular (seta vermelha) e um afunilamento ovariano (seta preta); e) Característica de um ovário (seta vermelha) após a indução hormonal e extrusão dos oócitos,

apresentando zonas hemorrágicas; f) Aparência macroscópica de um ovário (seta vermelha) após a segunda indução hormonal, apresentando muitos oócitos com coloração esbranquiçada, indicando um processo de atresia (detalhe no canto superior).



# 6

## *CAPÍTULO*

---

Desenvolvimento embrionário e estágios larvais de *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). Implicações para a conservação e cultivo desta espécie Neotropical ameaçada.

**MANUSCRITO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:  
NEOTROPICAL ICHTHYOLOGY**

Honji, R. M.; Tollussi, C. E.; Mello, P. H.; Caneppele, D. & Moreira, R. G.

**Embryonic development and larval stages of *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). Implications for the conservation and rearing of this endangered Neotropical species**

Renato M. Honji<sup>1</sup>, Carlos E. Tolussi<sup>1</sup>, Paulo H. Mello<sup>1</sup>, Danilo Caneppele<sup>2</sup> and Renata G. Moreira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, Trav. 14, 321, 05508-090, Brasil. honji@usp.br (RMH), ctolussi@usp.br (CET) phmello@usp.br (PHM), renatagm@ib.usp.br (RGM\*)

<sup>2</sup> – Companhia Energética de São Paulo (CESP), Unidade de Hidrobiologia e Aquicultura, Rodovia dos Tamoios, km 38. 12260-000, Brasil. danilo.caneppele@cesp.com.br (DC)

\* Corresponding author

**Keywords:** Early development, eggs and larvae, artificial reproduction, surubim do Paraíba

Running head: Ontogeny of the surubim do Paraíba.

**Abstract**

There are currently many problems with captive-breeding programs for endangered species. To combat these issues, an increasing number of conservation biologists are incorporating morphological and physiological research data to help conservation managers in rescue these endangered species. *Steindachneridion parahybae* is a freshwater catfish endemic to the Paraíba do Sul River and is classified as an endangered Neotropical species. To date, very little of its biology has been studied. This study investigates the embryonic and larval development of *S. parahybae* in captivity. Broodstocks were artificially induced to reproduce, and the extrusion occurred 200-255 degree-hours after hormonal induction at 24°C. Larval ontogeny was evaluated every 10 minutes under microscopic/stereomicroscopic using fresh eggs samples. The main embryogenic development stages were identified: cell division started about 2 minutes after fertilization (AF), the closed blastopore at 12 hours AF, somits and optic vesicles developed about 20 hours AF, and hatching occurred 54 hours AF. Gradual yolk sac reduction was observed during the first two days of larval development. The first



feeding occurred at the end of the second day. During the larval phase, we also observed cannibalism, heterogeneous larval growth and photophobia. This information will be important in improving the artificial reproduction protocols of *S. parahybae* in controlled breeding programs.

### Resumo

Existem atualmente muitos problemas com programas de criação em cativeiro de espécies ameaçadas de extinção. Para combater estes problemas, um número crescente de biólogos conservacionistas estão incorporando dados de pesquisas morfológicas e fisiológicas para ajudar os gestores de conservação no resgate destas espécies ameaçadas de extinção. *Steindachneridion parahybae* é um bagre de água doce, endêmico do Rio Paraíba do Sul e é classificada como espécie neotropical ameaçada. Para datar, muito pouco de sua biologia tem sido estudada. Este estudo investigou o desenvolvimento embrionário e larval de *S. parahybae* em cativeiro. Reprodutores foram artificialmente induzidos à reprodução e a extrusão ocorreu com 200-255 horas-graus após a indução hormonal a 24°C. A ontogenia larval foi avaliada a cada 10 minutos sob microscópio/estereomicroscópio, utilizando-se amostras de ovos recém coletados. Os principais estágios de desenvolvimento embrionário foram identificados: a divisão celular iniciou-se aproximadamente 2 minutos após a fertilização (AF), o fechamento do blastóporo a 12 horas AF, somitos e vesículas ópticas desenvolveram com aproximadamente 20 horas AF, e a eclosão ocorreu com cerca de 54 horas AF. Redução gradual do saco vitelínico foi observada durante os primeiros dois dias de desenvolvimento larval. A primeira alimentação ocorreu no final do segundo dia. Durante a fase larval, nós também observamos canibalismo, crescimento larval heterogêneo e fotofobia. Estas informações serão importantes para aperfeiçoar o protocolo de reprodução artificial em *S. parahybae* em programas de reprodução controlada.

### Introduction

The teleost order Siluriformes, which includes the largest number of living species, contains 2867 species known as “catfish” (Nelson, 2006). The Neotropical catfish genus *Steindachneridion* within the order Siluriformes, family Pimelodidae (Garavello, 2005), has six described species: *S. parahybae* (Steindachner, 1877), *S. amblyurum* (Eigenmann & Eigenmann, 1888), *S. doceanum* (Eigenmann & Eigenmann, 1889), *S. scriptum* (Miranda Ribeiro, 1918), *S. punctatum* (Miranda Ribeiro, 1918), *S. melanodermatum* (new species). Little is understood about the reproductive biology of this genus. This lack of knowledge is

likely because the species within this genus have a naturally restricted environment and are relatively hard to collect, resulting in a limited number of *Steindachneridion* species available for biological studies (Garavello, 2005). Additionally, many of these species are at risk for extinction because of environmental disturbances that result in the reduction of their natural habitat (Honji *et al.*, 2009).

The surubim do Paraíba, *Steindachneridion parahybae* (Fig. 1), is a medium-sized Neotropical catfish freshwater species endemic to the Paraíba do Sul River Basin and is critically threatened (Caneppele *et al.*, 2008; Honji *et al.*, 2009). There have been no recent reports of this species in the southern rivers of the Paraíba do Sul Basin (São Paulo, 2008); however, *S. parahybae* was commonly captured in the commercial fisheries along the Paraíba do Sul River during the 1950s (Machado & Abreu, 1952).

There are few studies on the reproductive biology of Brazilian Pimelodidae, although what has been observed describes the spawning strategies and larvae development of some species as, *Pseudoplatystoma fasciatum* and *Pseudoplatystoma corruscans* (Leonardo *et al.*, 2004; Campos, 2005, respectively). On the other hand, considering the number of species and their threatened situation, similar to the genus *Steindachneridion*, there is little descriptive information on the early development stages of this genus, and no information is available to *S. parahybae*.

Studies on the early development of fish not only yield information on spawning locations and the development features of the different species, but also allow comparisons between normal and altered development patterns (*i.e.*, assessing the influence of climate change). These data will be also of great use in determining the biological changes when the wild broodstocks are transferred to captivity (Meijide & Guerrero, 2000; Wikelski & Cooke, 2006). Many teleost species have reproductive dysfunction in captivity (Mylonas *et al.*, 2010), including *S. parahybae*, which results in problems with the production of fingerlings of native species in Brazil. Therefore, fish conservationists must investigate embryonic and larval development to find ideal conditions for the production of fingerlings and to obtain higher rates of survival in captivity (Honji *et al.*, 2011). Furthermore, the information garnered from field investigation is essential to ensure the success of conservation programs (Wikelski & Cooke, 2006). Similarly, conservation efforts in the field could be more successful if corroborated by captivity studies. Therefore, study of the development of various fish species in captivity is one of the first steps in helping conservation biologists rescue endangered species.

Captivity studies of fish are also applicable to aquaculture. The elucidation of feeding behavior, prey preferences, the ecology of the larvae of cultured fishes, and the marking of developmental time-points like yolk sack absorption and mouth opening (which varies among species) will determine the requirements for exogenous food during larval growth (Appelbaum & Mcgeer, 1998). For example, the high rate of cannibalism observed in cultured fishes is frequently due to inadequate larval food and an improper feeding regime, demonstrating the importance of studying larval development (Appelbaum & Mcgeer, 1998).

The aim of this study was to describe a structural analysis of the morphological events related to embryogenesis and larval ontogenesis of *S. parahybae*. We induced spawning in captive *S. parahybae* and followed progeny development from oocyte activation until the beginning of the juvenile period. This study is important in understanding the early development of genus *Steindachneridion* in order to contribute to the conservation of this species.

### Material and Methods

This study was performed at the Hydrobiology and Aquaculture Unit of the Energetic Company of São Paulo State (CESP) located in Paraibuna city, São Paulo State, Brazil (23°41'39'' S and 45°60'42'' W). This study is also associated with the conservation program of endangered species of the Paraíba do Sul Basin, undertaken by CESP (Caneppele *et al.*, 2009). During 2003, fifteen *S. parahybae* individuals were caught in the Paraíba do Sul River, near the town of Rio das Flores in the State of Rio de Janeiro (22°13'54'' S and 43°25'15'' W), and these individuals were brought to the CESP hatchery to induce spawning. Descriptions of the fishing gear, catch operations and induced spawning of this wild broodstock were followed in accordance with Caneppele *et al.* (2009).

#### *Broodstock selection, hormonal induction and spawning*

In December 2007 and January 2008, two artificial reproductions were performed using two females and two males selected on the basis of the typical morphological characteristics of sexual ripeness, according to the principles previously established for *S. parahybae* (Caneppele *et al.*, 2009). Briefly, the females were selected by external characteristics of the hyperemic genital pore and swollen abdomen. Males were chosen according to the color and fluidity of milt when the abdominal region was compressed. The protocol for broodstock selection for artificial reproduction was previously described for the genus *Steindachneridion* (Ludwig *et al.*, 2005; Adamante *et al.*, 2007; Caneppele *et al.*, 2009).

Animals were caught in ponds, transferred to the laboratory, kept in 1,000 L tanks, and then induced to reproduce by combining carp pituitary extract (CPE; Fish Braz) and human Chorionic Gonadotropin (hCG; Pregnyl – Organon) in the same application. For the hormonal induction, the CPE protocol was performed according to methods previously described for *S. parahybae* (Caneppele *et al.*, 2009). Two CPE doses (0.6 mg and 5.4 mg of CPE per kg of body weight, diluted in 0.9% sodium chloride solution) were given to females with a 12 hour interval between doses. Males were given a single dose at the same time as the females' second dose; this dose contained 3 mg of CPE per kg and was also diluted in 0.9% sodium chloride solution. A single dose of hCG application was given to both females and males at the same time as the second CPE application. The hCG concentration used was 2 IU per kg<sup>-1</sup> for females and 1 IU per kg<sup>-1</sup> for males. The dosages used in this study and the broodstock's weight and length are displayed in Table 1.

After hormone induction, each couple was placed in a glass tank (1,000 L) to facilitate the observation of their sexual behavior during spawning. The time necessary for gamete elimination, counted from the second hormone administration until spawning, was calculated as Accumulated Thermal Unit (ATU), or degree-hours. Subsequently, the gametes from males and females were stripped in plastic containers and the dry extrusion was carried out. The oocytes were kept in a bowl, the sperm were added and then the mixture was gently homogenized. Water was then added for hydration to allow fertilization (according to the protocol described by Caneppele *et al.*, 2009).

Six hours after the eggs were placed in the conical incubator, the fertility rate was calculated using the equation  $F = (\text{number of fertilized eggs} \times 100) / \text{number of total eggs}$  (Vazzoler, 1981, 1996). We also measured the temperature and dissolved oxygen every hour (Horiba – ModU10), and all recorded values were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (M  $\pm$  SEM).

### *Egg and larval analysis*

The main morphological features of each developmental stage were described. The oocytes, eggs and larvae at each sampling, were measured using a Leica DM1000 microscope or Leica S6D stereomicroscope connected Leica DFC295 camera and using a computer image capture Leica Application Suite professional. Every ten minutes, fresh eggs samples were collected for analysis and a photographic record was taken until hatching. After hatching, larvae were sampled at every twenty four hours during the first ten days (at the same hour of day). We also collected samples at each major macroscopic ontogenetic change, and fixed some eggs

and larvae in Bouin's solution for 20-24 hours (depending on the samples size) for routine histological techniques. Briefly, samples were dehydrated through an ascending series of increasing concentrations of ethanol, cleared in dimethylbenzene (xylene), and embedded in Paraplast (Erv-Plast; Erviegas Instrumental Cirúrgico, São Paulo, Brasil), and 5  $\mu\text{m}$  thick sections were stained with hematoxylin-eosin (Behmer *et al.*, 1976). The slides were examined, and imaged using the Leica microscope and camera.

All eggs and larvae were fixed according to the institutional animal care protocols and approval (Protocol: 072/2008). Histological slices are preserved in the collection of the Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

#### *Terminology for embryonic development*

The nomenclature describing embryonic development and the early larval stages can sometimes be confusing because of the variety of terms used by different authors. In this study, we use the nomenclature described by Nakatani *et al.* (2001) and Richards (2006) to describe the embryonic and larval development stages:

- Egg stage: the period from fertilization until hatching. In this stage, an egg consists of a chorion, perivitellinic space and the embryo with a yolk sac observed in the center.

- Larval stage with yolk sac: This stage includes the time from hatching until the start of the exogenous feeding. The duration of this stage varies widely among fish species.

- Larval stage - exogenous feeding: This stage includes the start of exogenous feeding and can last for a few days to months (depending on the temperature and species). In this study, the duration of this stage was established as ten days.

## **Results**

#### *Water quality*

The water qualities during the artificial reproduction and embryonic development are shown in Table 2. The average water temperature and dissolved oxygen concentration during the artificial hormonal reproduction (first and second doses), spawning season, and annual mean, respectively, were as follows:  $23.75 \pm 0.75^\circ\text{C}$  and  $7.94 \pm 0.20$  mg/l;  $23.70 \pm 1.10^\circ\text{C}$  and  $7.67 \pm 1.03$  mg/l;  $24.13 \pm 0.47^\circ\text{C}$  and  $7.70 \pm 0.79$  mg/l;  $21.10 \pm 0.14^\circ\text{C}$  and  $7.58 \pm 0.36$  mg/l. Furthermore, during the ten first days of the embryonic/larval development the average water temperature and dissolved oxygen was:  $22.40 \pm 0.27^\circ\text{C}$  and  $7.30 \pm 0.33$  mg/l.

### *Broodstock selection, hormonal induction and spawning*

The reproductive period of *S. parahybae* at CESP Fish Farm was during the summer, when the broodstocks (100% survival) induced to spawning responded positively to the artificial reproduction. The spawning (by dry method) occurred within 200 - 255 ( $231 \pm 16.25$ ) ATU (about 24°C), and the fertilization rate was about  $69.50 \pm 10.20\%$  (Table 1).

### *Egg and larval analysis*

#### *Egg stage*

Oocytes were yellow, nonadhesive, and ovoid in shape with an average diameter of  $1.10 \pm 0.10$  mm (Fig. 2a). After hydration, the average diameter increased to about  $1.90 \pm 0.60$  mm (Fig. 2b). Following spawning and fertilization, it was possible to visualize the poles (animal and vegetative), the chorion and the perivitelline space. Below, we will describe the stages of embryogenesis when the eggs were incubated at a temperature of  $23.75 \pm 0.75^\circ\text{C}$ . The time after fertilization (AF) is reported in parentheses.

The animal pole formed 30 min AF. The first cell division occurred 1 h 20 min AF in the blastodisc, yielding two blastomeres (Fig. 2c). Four, eight, sixteen, thirty-two and sixty-four blastomeres (1 h 40 min, 1 h 50 min, 2 h, 2 h 10 min, and 2 h 40 min AF) were the result of successive divisions during embryogenesis (respectively, Figs. 2d, e, f, g, h).

The initial gastrula (2 h 50 min AF), the final gastrula, and blastopore closure (11 h 20 min AF) could be identified in most embryos (Fig. 3a). Following this period, it was possible to distinguish between the cranial and caudal regions (14 h 25 min) (Figs. 3b). During morphogenesis and organogenesis (20 h 10 min AF), the optic vesicles and somites were also observed. The tail of the embryo (Fig. 3c) appeared completely free from the yolk sac (25 h AF), and some contractions in the embryos were observed during this period. Total hatching (54 h AF) with tail movements yielded a larvae with an average length of  $4.30 \pm 0.70$  mm (Fig. 3d).

#### *Larval stage with yolk sac and larval stage – exogenous feeding*

Day 1 (average length  $4.00 \pm 0.70$  mm): After hatching (AH), the larvae were still translucent, and the body was non-pigmented (Fig. 3e). After 23 h AH, we observed a slight reduction in the yolk sac, the early formation of barbells and that the mouth had not opened yet.

Day 2 (average length  $4.60 \pm 1.20$  mm): A reduction in the yolk sac was observed, and the barbells were more visible (38 h 30 min) (Fig. 3f). Gill development was observed, and

some larvae, but not all, opened their mouths (40 h AH). Approximately 50 h AH, exogenous food composed of lambari (*Astyanax altiparanae*) larvae was offered. At that point, most *S. parahybae* larvae had open mouths, eyes with pigmented retinas (Fig. 3g), and an even smaller yolk sac.

Day 3 (average length  $5.40 \pm 2.10$  mm): Exogenous feeding started by this time, and we observed that the *S. parahybae* larvae were completely full of food (about 60 h AH). We could no longer detect the yolk sac by histological analysis, and the barbells were formed (Fig. 3h), although we did not observe well marked fins. At this time (about 60 h AH), we also observed some cannibalism among the *S. parahybae* larvae (Figs. 4a, b).

Days 4 to 10: at approximately 80 h AH, curimbatá (*Prochilodus lineatus*) larvae were offered, and we observed intense cannibalism. After 100 h 57 min AH, exogenous feeding was initiated with a prepared food (a 4:1 mixture of commercial fish food with 45 % of crude protein and milled fish). Even when curimbatá larvae were offered, we observed cannibalism among *S. parahybae* larvae (Figs. 4a, b). However, some larvae fed on prepared food (Fig. 4c) while others fed on curimbatá larvae (Fig. 4d). We also observed that the *S. parahybae* larvae displayed photophobia.

After three months, *S. parahybae* juvenile were an average length of  $11.00 \pm 2.20$  cm. The time scales of the major events in the early development of *S. parahybae* are shown in figure 5.

#### *Histological analysis*

Ovary samples showed vitellogenic oocytes with central or slightly eccentric nuclei (Fig. 6a) with small nucleoli. Furthermore, the follicular layers were developed and could be easily seen even at this level of analysis (Fig. 6a). After fertilization and egg activation (0 m AF), it was possible to identify the perivitellinic space and the yolk granules (Fig. 6b). The final gastrula and blastopore closure (11 h 20 min AF) and the differentiation between the cranial and caudal regions was observed microscopically (Fig. 6c).

Day 1 (after hatching): In the cranial region, we could identify the head, attached to the yolk sac, and the neurocranium. In the caudal region, we could identify the embryonic tail (Fig. 6d). At 34 h AH, the main structures of the larvae head were identified: eye, operculum, gill arches, and neurocranium (Fig. 6e). By the end of the second day, we could also identify the main features of the fish: head, tail, stomach, and others structures (Fig. 6f).

Early on the third day, we did not detect food in the larvae's stomach, despite the mouth being open (Fig. 5f). However, at 60 h AH, we could identify all features of the

digestive system as shown in Figures 6g, h, i (mouth, esophagus, stomach, gut, and other) and some food in the digestive system (lambari or curimbatá larvae).

## Discussion

The water quality parameters analyzed in the present study were close to other research's which observed embryonic and larval development in other Neotropical species, mainly for the Siluriformes order, *i.e.*, *Pimelodus maculatus*, *Rhamdia quelen*, *P. fasciatus* (Barcellos *et al.*, 2004; Leonardo *et al.*, 2004; Weingartner & Zaniboni-Filho, 2004), and fish of the same genus of *S. parahybae*, as *S. scripta* (Adamante *et al.*, 2007), *S. scriptum* (Schütz *et al.*, 2008), and *S. melanodermatum* (Feiden *et al.*, 2006). Therefore, we believe that the physical and chemical parameters monitored throughout the experiment did not change the pattern of embryonic and larval development of surubim do Paraíba.

The ATU values observed in this study were similar to those of other catfish species in the Pimelodidae family (Weingartner & Zaniboni-Filho, 2004; Campos, 2005), including other wild broodstocks of *S. parahybae* in captivity (Caneppele *et al.*, 2009). Furthermore, the results of spawning induction experiments in *S. parahybae* from the wild broodstocks indicated that artificial reproduction is viable although the surubim do Paraíba females release only a small amount of eggs (~53g per females) (Caneppele *et al.*, 2009). Using hormonal induction, we observed a slight increase in the amount of eggs released (~92g per females). Despite this slight increase, the amount of eggs that was released is below that observed in other Neotropical catfish (Caneppele *et al.*, 2009).

The small quantity of eggs released during the artificial induction of *S. parahybae* can reflect the gonadosomatic index values, which increased during the final gonadal maturation and were similar after the hormonal induction of domesticated broodstock (unpublished data). Macroscopic and microscopic analysis of the gonads of *S. parahybae* may help explain the small quantity of eggs released. The pattern of oocyte development seems to be synchronic in groups with multiple spawnings during the reproductive season (unpublished data). This strategy of multiple spawning was also observed in *P. corruscans* where females visit the spawning sites multiple times during the spawning season (November-March) (Godinho *et al.*, 2007), suggesting that *P. corruscans* is a multiple spawner.

Hand-stripping, followed by dry gamete fertilization is a good technique for *S. parahybae* (Caneppele *et al.*, 2009), and the embryonic and larval development is similar to other Siluriformes species. The animal pole forms in *S. parahybae* at about 30 min, which was similar to *P. maculatus* at 23.1°C (Luz *et al.*, 2001). In *P. maculatus* the beginning of



successive divisions in the animal pole was observed at 40 min AF; 32 blastomere was observed at 1 h 40 min AF; and the blastopore closed was identified after 5 h 50 min AF (Luz *et al.*, 2001). These results show that *P. maculatus* developed faster than *S. parahybae*. In *P. corruscans* the appearance of the animal pole and successive divisions began around 1 h and high blastula stage occurred within 2 h 50 min AF (at 23.5-25.0°C) (Cardoso *et al.*, 1995). The blastopore in *S. parahybae* closed at 11 h 20 min AF, slightly later than that of *P. corruscans*, which occurred after 6 h AF under similar temperatures. Furthermore, the *P. corruscans* larvae at 25-26°C displayed blastopore closure at 6 h 30 min AF (Cardoso *et al.*, 1995). Other Siluriformes species like *Heterobranchus longifilis* and *Clarias gariepinus* have an early embryonic development similar to *S. parahybae*, indicating that the development of surubim do Paraíba eggs generally follows that of other fish species, with small differences in time of development (Legendre & Tcugcls, 1991).

At 11 h 20 min AF, it was possible to distinguish the cranial and caudal region in *S. parahybae*. However, in *P. corruscans* (Cardoso *et al.*, 1995), *P. maculatus* (Luz *et al.*, 2001), and *Rhamdia hilarii* (Godinho *et al.*, 1978), this distinction occurred at 7 h 50 min, 10 h 50 min, and 7 h 30 min AF, respectively, under similar temperature conditions. Furthermore, the somites and optical vesicle of *P. corruscans* were visible during this period, but they were not visible in *S. parahybae* until 20 h 10 min AF. This result demonstrates the great difference in embryonic development between species, even those belonging to the same family.

The hatching period of *S. parahybae* (54 h at 23°C) is later than other Siluriformes species, such as *P. corruscans*, which hatched 16 h AF at a temperature of 24.5°C when the larvae were an average size of 2.51 mm (Nakatani *et al.*, 2001). Similar times were observed in *H. longifilis* and *C. gariepinus* (Legendre & Tcugcls, 1991). *P. maculatus* larvae hatched at 14 h 30 min AF at 25.5 ± 0.3°C with the larvae measuring 2.56 ± 0.13 mm, or at 12 h AF when reared at 27.6 ± 1.4°C (Luz *et al.*, 2001). Most fish species which migrate to reproduce have a rapid embryonic development, *i.e.*, 22 h at 24°C for *Prochilodus scrofa* (Cavicchioli & Leonhardt, 1993), 18 h at 25-26°C for *Colossoma macropomum*, and 22 h at 25-26°C for *Piaractus mesopotamicus* (Ribeiro *et al.*, 1994). Interestingly, even though *S. parahybae* migrate to mate, their progeny do not develop quickly. The embryonic development time showed by *S. parahybae* is similar to or even faster than non-migratory fish species, such as *Hoplias malabaricus* and *Parauchenipterus galeatus*, which hatched 44 h at 24-26.5°C and 64 h at 27-28°C AF, respectively (Sanches *et al.*, 1999, 2001).

During the larval development, adequate levels and intensity of light are required to optimize growth of many fish species (Boeuf & Bail, 1999). The rapid growth of larvae

during this period depends upon vision in order to find food, select prey, and avoid predators (Appelbaum & Mcgeer, 1998; Boeuf & Bail, 1999). In contrast, other species, including Siluriformes, such as, *C. gariiepinus* (Appelbaum & Mcgeer, 1998), *P. maculatus* (Luz *et al.*, 2001), *R. quelen* (Boeuf & Bail, 1999), *Steindachneridion sp.* (Feiden *et al.*, 2005, 2006), *S. scriptum* (Schütz *et al.*, 2008), the larvae can feed independent of the vision, because they show photophobia, having a better development when they are stored in dark or low intensity light (Appelbaum & Mcgeer, 1998; Schütz *et al.*, 2008). Furthermore, studies with Siluriformes species indicate that dark environments also reduce the stress and consequently improve larval development (Appelbaum & Mcgeer, 1998; Feiden *et al.*, 2005, 2006). Previous studies of *S. parahybae* larvae (Caneppele *et al.*, 2009) and this study observe photophobia in *S. parahybae* larvae. Therefore, further studies of the influence of light on *S. parahybae* larval growth should be performed.

The main problem with the larviculture of neotropical species in Brazilian Fish Farms (including *S. parahybae*) is the lack of knowledge about feeding during the larval development, mainly due to a lack of ecological, behavioral, and ontogenetic studies during this period. Much larvae mortality is directly related to inadequate feeding practices, which, in most cases, do not meet the real nutritional needs of larvae (Appelbaum & Mcgeer, 1998). Although some techniques that use inert feed (starters) are well known and efficient for some species, many others species do not become accustomed to this management (Kamler, 1992). Thus, the employment of live food, as performed in the present study is recommended. We offered live food to *S. parahybae* larvae at first and transitioned to inert food on the eighth day. In our study, the surubim do Paraíba larvae accepted this transition period, although we did observe some cannibalism during this period. Additionally, carnivorous fish larvae do not have a fully developed gastrointestinal tract and enzymatic activity when exogenous feeding begins (Dabrowski, 1984). Consequently, these animals are not able to digest inert food. This fact furthermore suggests that these larvae use the enzymes present in live food for digestion, in a process known as autolysis (Dabrowski, 1984).

Cannibalistic behavior, present when feeding practices are not adequate, is the main source of larvae mortality and production decrease in aquaculture. During rearing, which typically occurs in small ponds in larviculture, the chance of cannibalism is higher because of a higher density of larvae and a decreased chance of escape from predation (Smith & Reay, 1991). Furthermore, heterogeneous growth in fish larvae is always observed in many teleost, such as seen in *C. gariiepinus* (Hecht & Pienaar, 1993) and in *S. parahybae* larvae (Caneppele *et al.*, 2009) as also evidenced by the present study.

Cannibalism behavior was observed in 36 of 410 teleost families, with several species showing this behavior approximately 50 h AF dependent upon temperature (Smith & Reay, 1991; Nelson, 2006). To decrease the intensity of cannibalism, the following techniques can be applied: increase food availability, maintain shorter intervals of feeding, and lower the stocking density (Howell *et al.*, 1998). *S. parahybae* larvae showed a greater growth homogeneity and survival, with reduced cannibalism, when they were maintained in dark environment, at low stocking density, and with plenty of food available, ideally live food (fish prey) followed by inert food (Caneppele *et al.*, 2009). These techniques, applied in the present study, were also observed in the genus *Steindachneridion*, such as *S. melanodermatum* (Ludwig *et al.*, 2005; Feiden *et al.*, 2006), *S. scriptum* (Schütz *et al.*, 2008), and *S. scripta* (Adamante *et al.*, 2007) when larvae were started with live food followed by inert food.

Many recent studies have shown the importance of conservation biology in the rescue of endangered wildlife (Wikelski & Cooke, 2006). There are implications for the conservation of *S. parahybae* from the present study. The events in embryonic development and feeding behavior of fish larvae observed here allow for the development of strategies to obtain success in larval rearing. For example, a live food diet (forage larvae) in the early days of larval development and a gradual transition to an artificial diet will increase the survival of larvae. Since *S. parahybae* is endangered, this information is critical in contributing to the success of artificial reproduction programs (Honji *et al.*, 2009). It is our recommendation that immediate action be taken in order to avoid the extinction of this species in the Paraíba do Sul Basin.

The main threats to *S. parahybae* are the construction of dams, riparian habitat destruction, water pollution and fishing (Honji *et al.*, 2009). Since 2003, CESP has conducted research on the biology of *S. parahybae*, including the maintenance of broodstocks and successful larval rearing, in order to ensure the conservation of this species. Furthermore, the first step in the study of any species is to obtain knowledge of the embryonic and larval stages. This knowledge allows for morphological and physiological understanding of the species and helps to control the period of the larvae vulnerability. With information about appearance of organs, their functionality and their exact time of emergence, it is possible to establish management protocols and specific food recommendations for this critical phase. This information is even more important in this study, because is the first characterize *S. parahybae* development, considering the status of conservation, *i.e.*, listed in the Brazilian red list (Caneppele *et al.*, 2009), and regionally extinct in the São Paulo State (São Paulo, 2008; Honji *et al.*, 2009).

In conclusion, this study investigated the ontogeny and organogenesis of early development of *S. parahybae*. These data provide information that can be used to improve feeding protocols and to establish specific conservation management for this endangered catfish. Our data, together with the findings previously described by Caneppele *et al.* (2009), contribute to the recovery of this threatened species by giving biological tools to conservation biologists and aquatic physiologists to predict and solve future problems.

### Acknowledgments

The authors would like to thank the local fishermen who helped to collect the wild females, Ms. Eduardo Sanches for providing the cannibalism pictures, CESP (Companhia Energética de São Paulo) for providing the Fish Farm facilities and FAPESP (2007/55949-7 and 2008/57687-0) for financial support.

### Literature Cited

- Adamante, W. B., M. Weingartner & A. P. O. Nuñez. 2007. Feed transition in larval rearing of bocudo, *Steindachneridion scripta* (Pisces, Pimelodidae), using *Artemia spp. Nauplii* and artificial diet. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(5): 1294-1300.
- Appelbaum, S. & J. C. Mcgeer. 1998. Effect of diet and light regime on growth and survival of African catfish (*Clarias gariepinus*) larvae and early juveniles. *Aquaculture Research*, 4: 157-164.
- Barcellos, L. J. G., L. C. Kreutz, R. M. Quevedo, I. Fioreze, L. Cericato, A. B. Soso, M. Fagundes, J. Conrad, R. K. Baldissera, A. Bruschi & F. Ritter. 2004. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture*, 232: 383-394.
- Behmer, O. A., E. M. C. Tolosa & A. G. F. Neto. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART, São Paulo, 239p.
- Boeuf, G. & P. Y. Bail. 1999. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture*, 177: 129-152.
- Campos, J. L. 2005. O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz, 1829). Pp. 303-319. In: Baldisserotto, B. & L. C. Gomes (Eds.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Ed. UFSM, 470p.

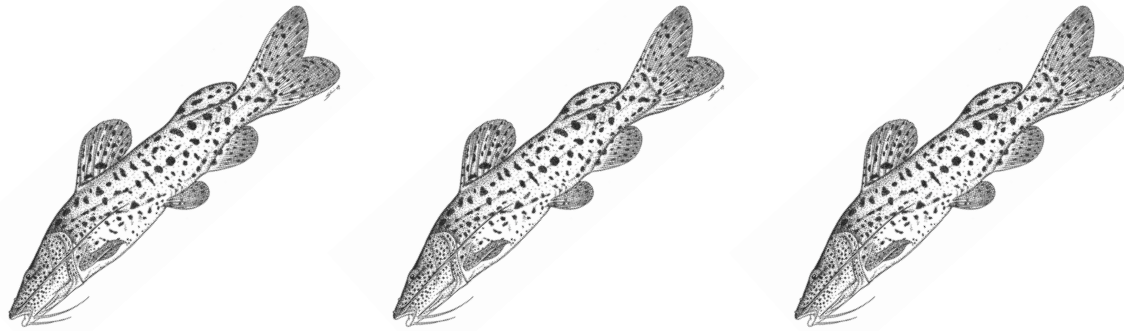
- Caneppele, D., P. Pompeu & J. Garavello. 2008. *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1876). Pp. 236-238. In: Machado, A. B. M., G. M. Drummond & A. P. Paglia (Eds.). Livro vermelho da fauna Brasileira ameaçada de extinção. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Departamento de Conservação da Biodiversidade. Brasília, DF, 908p.
- Caneppele, D., R. M. Honji, A. W. S. Hilsdorf & R. G. Moreira. 2009. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, 7(4): 759-762.
- Cardoso, E. L., M. S. D. Alves & R. M. A. Ferreira. 1995. Embryogenesis of the neotropical freshwater Siluriforme *Pseudoplatystoma corruscans*. *Aquatic Living Resources*, 8: 343-346.
- Cavichcholi, M. & J. H. Leonhardt. 1993. Estudo do desenvolvimento morfológico de larvas de Curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1882), obtidas de reprodução induzida. *Revista Unimar*, 15: 109-124.
- Dabrowski, K. 1984. The feeding of fish larvae: Present "State of the art" and perspectives. *Reproduction Nutrition Development*, 24: 807-833.
- Feiden, A., C. Hayashi, W. R. Boscolo & A. Reidel. 2006. Desenvolvimento de larvas de *Steindachneridion sp.* em diferentes condições de refúgio e luminosidade. *Pesquisa Agropecuária Brasília*, 41(1): 133-137.
- Feiden, A., C. Hayashi, W. R. Boscolo & A. Signor. 2005. Desenvolvimento do surubim do Iguaçu (*Steindachneridion sp.*, Garavello (1991)) (Siluroidei: Pimelodidae) em ambiente escuro durante a fase inicial, alimentado com diferentes dietas. *Semina, Ciências Agrárias*, 26(1): 109-116.
- Garavello, J. C. 2005. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, 3(4): 607-623.
- Godinho, A. L., B. Kynard & H. P. Godinho. 2007. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco River, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 80: 421-433.
- Godinho, H. M., N. A. Fenerich & M. Y. Narahara. 1978. Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 38: 151-156.
- Hecht, T. & A. G. Pienaar. 1993. A review of cannibalism and its implications in the fish larviculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24: 246-261.

- Honji, R. M., D. Caneppele, A. W. S. Hilsdorf & R. G. Moreira. 2009. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). *Environmental Biology of Fishes*, 85: 207-208.
- Honji, R. M., P. H. Mello, B. C. Araújo, J. A. Rodrigues-Filho, A. W. S. Hilsdorf & R. G. Moreira. 2011. Influence of spawning procedure on gametes fertilization success in *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae): implications for the conservation of this species. *Neotropical Ichthyology*, 9(2): 363-370.
- Howell, B. R., O. J. Day, T. Ellis & S. M. Baynes. 1998. Early life stages of farmed fish. Pp. 27-66. In: Black, K. D. & A. D. Pickering (Eds.). *Biology of farmed fish*. Sheffield Academic Press, Sheffield, 429p.
- Kamler, E. 1992. Early life history of fish: an energetics approach. Chapman & Hall, Fish and Fisheries Series 4, London, 267p.
- Legendre, M. & G. G. Teugels. 1991. Développement et tolérance à la température des oeufs de *Heterobranchus longifilis* et comparaison des développements larvaires *H. longifilis* et de *Clarias gariepinus* (Teleostei, Clariidae). *Aquatic Living Resources*, 8(4): 227-240.
- Leonardo, A. F. G., E. Romagosa, M. I. Borella & S. R. Batlouni. 2004. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). *Aquaculture*, 240: 451-461.
- Ludwig, L. A. M., E. Gomes & R. F. Artoni. 2005. Um método de reprodução induzida para o surubim *Steindachneridion melanoderdatum* (Siluriformes: Pimelodidae) do Rio Iguaçu. *Ciências Biológicas e da Saúde*, 11(3/4): 23-27.
- Luz, R. K., D. A. Reynalte-Tataje, A. A. Ferreira & E. Zaniboni-Filho. 2001. Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 27(1): 49-55.
- Machado, C. E. & H. C. F. Abreu. 1952. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo. A pesca no Vale do Paraíba. *Boletim Industrial Animal*, 13: 145-160.
- Meijide, F. J. & G. A. Guerrero. 2000. Embryonic and larval development of a substrate-brooding cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) under laboratory conditions. *Journal of Zoology*, 252: 481-493.
- Mylonas, C. C., A. Fostier & S. Zanuy. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 516-534.

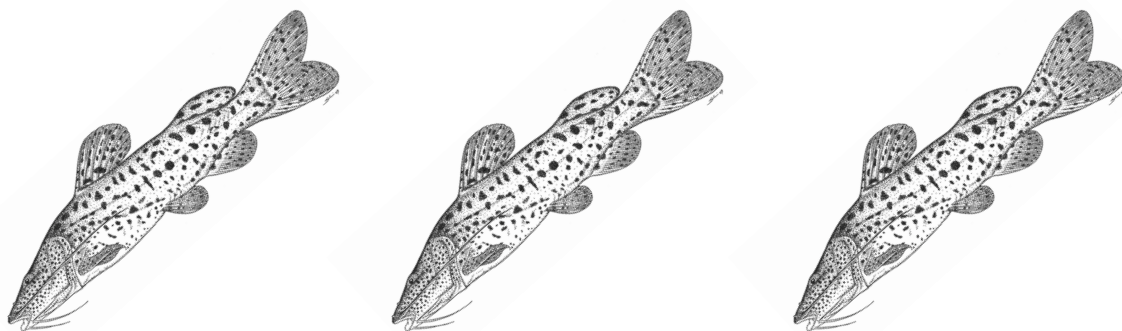
- Nakatani, K., A. A. Agostinho, G. Baumgartner, A. Bialtzki, P. V. Sanches, M. C. Makrakis & C. S. Pavanelli. 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e identificação. Maringá, Paraná, EDUEM, 378p.
- Nelson, J. S. 2006. Fishes of the World. John Wiley and Sons, Inc. New York, 601p.
- Ribeiro, C. R., H. S. Leme dos Santos & A. A. Bolzan. 1994. Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (pacu, *Piaractus mesopotamicus*; tambaqui *Colossoma macropomum* e híbrido tambacu). Revista Brasileira de Biologia, 55(1): 65-78.
- Richards, W. J. 2006. Early stages of Atlantic Fishes. An identification guide for the Western Central North Atlantic. Taylor & Francis, 2643p.
- Sanches, P. V., G. Baumgartner, A. Bialezki, M. R. Suiberto, F. D. C. Gomes, K. Nakatani & N. D. C. Barbosa. 2001. Caracterização do desenvolvimento inicial de *Leporinus friderici* (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do Rio Paraná, Brasil. Acta Scientiarum, 23(2): 382-389.
- Sanches, P. V., K. Nakatani & A. Bialezki. 1999. Morphological description of the developmental stages of *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes, Auchenipteridae) on the floodplain of the upper Paraná River. Revista Brasileira de Biologia, 59: 429-438.
- São Paulo. 2008. Decreto Estadual nº 53494-2008 de 02 de outubro de 2008. Diário Oficial do Estado de São Paulo 118 (187). Secretaria do Meio Ambiente.
- Schütz, J. H., M. Weingartner, E. Zaniboni-Filho & A. P. O. Nuñez. 2008. Crescimento e sobrevivência de larvas de surubi *Steindachneridion scriptum* nos primeiros dias de vida: influência de diferentes alimentos e fotoperíodos. Boletim do Instituto de Pesca, 34(3): 443-451.
- Smith, C. & P. Reay. 1991. Cannibalism in teleost fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1: 41-64.
- Vazzoler, A. E. A. M. 1981. Manual de métodos para estudos biológicos de populações de peixes: reprodução e crescimento. CNPq, Brasília, 108p.
- Vazzoler, A. E. A. M. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá, EDUEM, 169p.
- Weingartner, M. & E. Zaniboni-Filho. 2004. Efeito de fatores abióticos na larvicultura de pintado amarelo *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803): salinidade e cor de tanque. Acta Scientiarum, 26(2): 151-157.
- Wikelski, M. & S. J. Cooke. 2006. Conservation physiology. Trends in Ecology & Evolution, 21(2): 38-46.







**TABLES: CHAPTER 6**





**Table 1.** *Steindachneridion parahybae* reproduction at CESP Fish Farm during their reproductive periods (December/2007 and January/2008). Data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean.

Animals		N	Mean $\pm$ SD	hCG (IU/kg)	First CPE dose (mg/kg)	Second CPE dose (mg/kg)	Eggs spawned weight (g)
Females	Total weight (g)	8	2025.00 $\pm$ 319.83	2	0.60	5.40	92.20 $\pm$ 29.99
	Total length (cm)		55.75 $\pm$ 2.32				
Males	Total weight (g)	8	1675.00 $\pm$ 209.66	1	-	3.00	
	Total length (cm)		53.00 $\pm$ 2.12				
Interval between doses					12 hours		
Accumulated thermal unit (ATU)				200 – 255 (231 $\pm$ 16.25)			
Fertilization rate				69.50 $\pm$ 10.20 %			

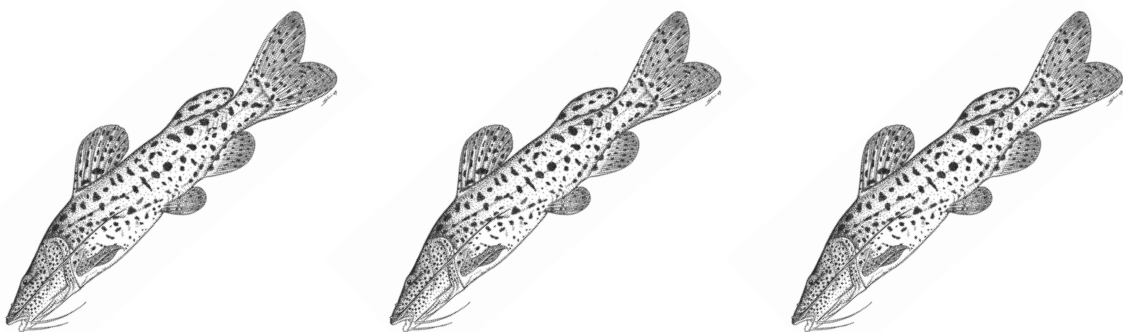
**Table 2.** Water quality during the period of artificial reproduction at CESP Fish Farm. Data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean.

Period of artificial reproduction	Water temperature (°C)	Dissolved oxygen (mg/L)
First injection (0.6 mg CPE/kg)	23.75 $\pm$ 0.75	7.94 $\pm$ 0.20
Second injection (5.40 mg CPE/kg)	23.70 $\pm$ 1.10	7.67 $\pm$ 1.03
Spawning	24.13 $\pm$ 0.47	7.70 $\pm$ 0.79
Ten first days	22.40 $\pm$ 0.27	7.30 $\pm$ 0.33
Annual mean	21.10 $\pm$ 0.14	7.58 $\pm$ 0.36





**FIGURES: CHAPTER 6**



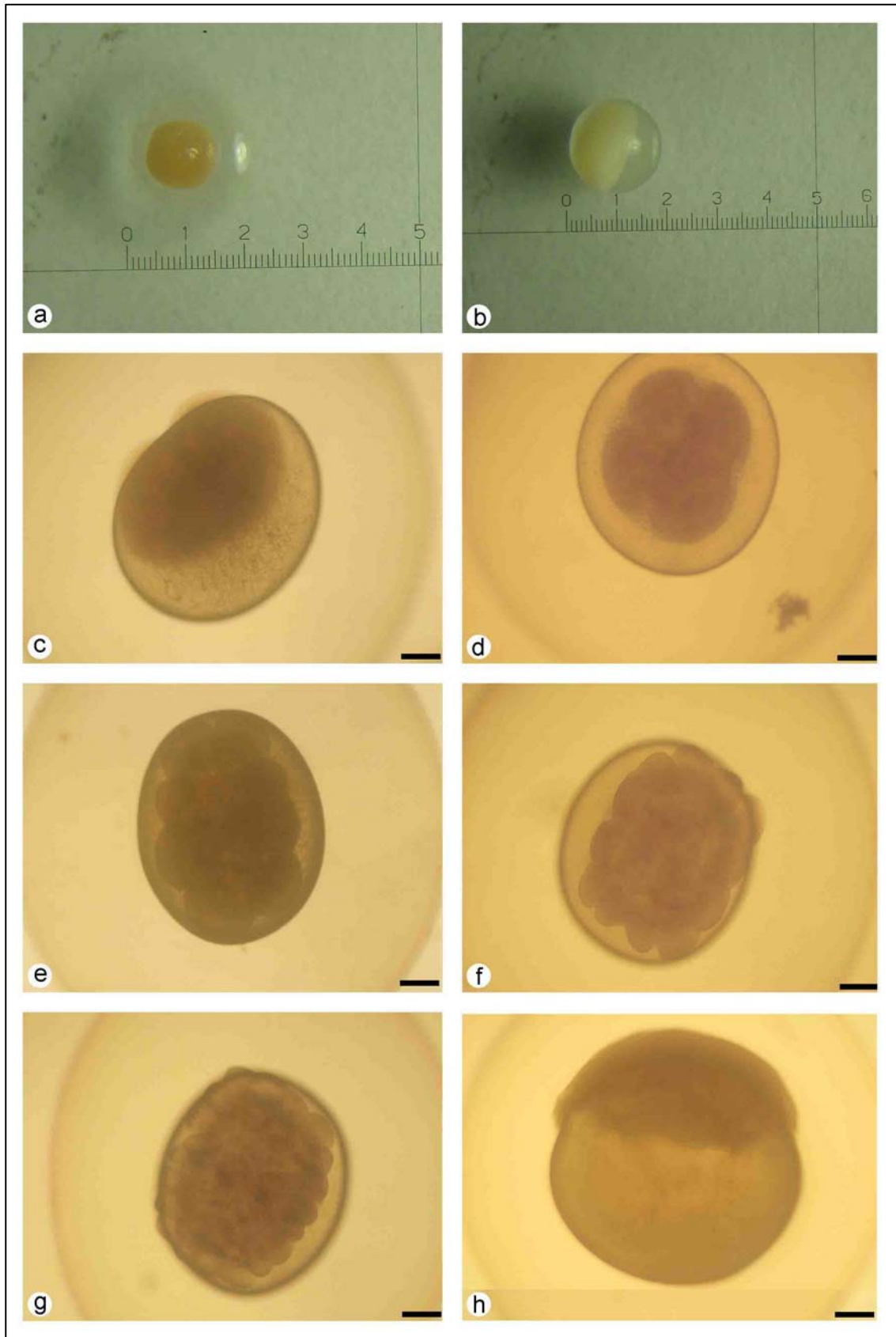




**Fig. 1** Dorsal, lateral and ventral views of *Steindachneridion parahybae*. Broodstock female, 52 cm total length, Paraíba do Sul Basin, Paraibuna, São Paulo State, Brazil.



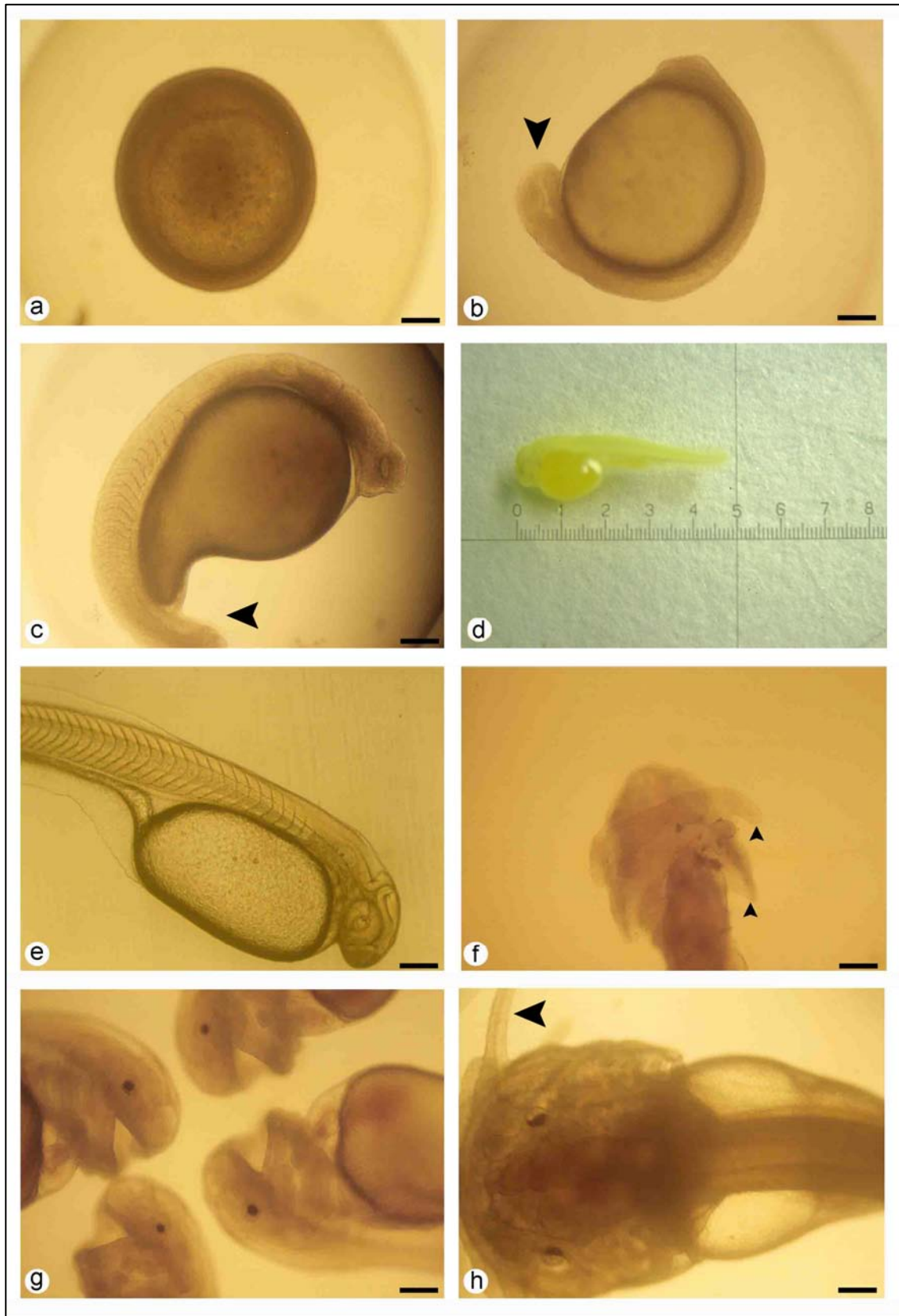




**Fig. 2** Macroscopic aspects of embryonic development of *Steindachneridion parahybae*. a) oocyte extruded (just after spawning and before fertilization) –  $1.10 \pm 0.10$  mm; b) egg

---

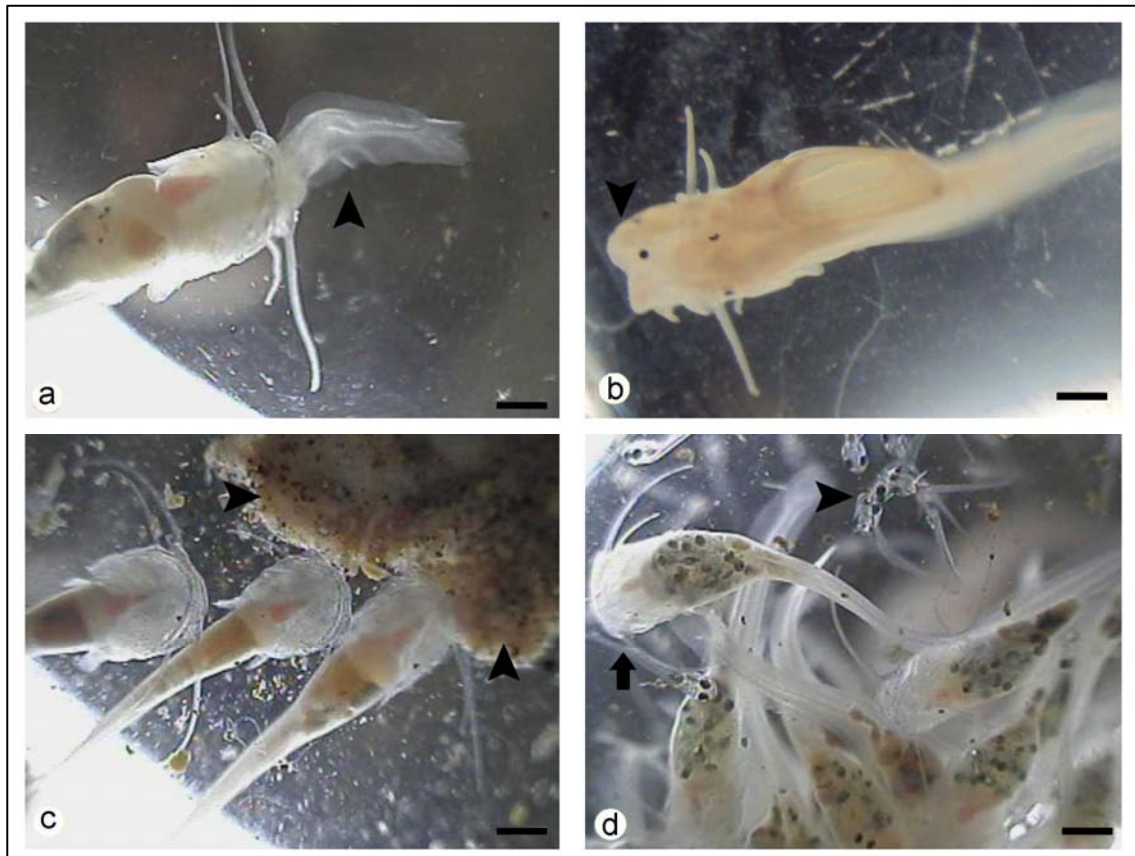
hydrated soon after fertilization (time zero AF) –  $1.90 \pm 0.60$  mm; c) two blastomeres (1 h 20 min AF); d) four blastomeres (1 h 40 min AF); e) eight blastomeres (1 h 50 min AF); f) sixteen blastomeres (2 h AF); g) thirty-two blastomeres (2 h 10 min AF); h) sixty-four blastomeres (2 h 40 min AF). Bars: (c-h) 1 cm.



**Fig. 3** Macroscopic aspects of embryonic and larval development of *Steindachneridion parahybae*. a) final gastrula and blastopore closure (11 h 20 min AF); b) differentiation of

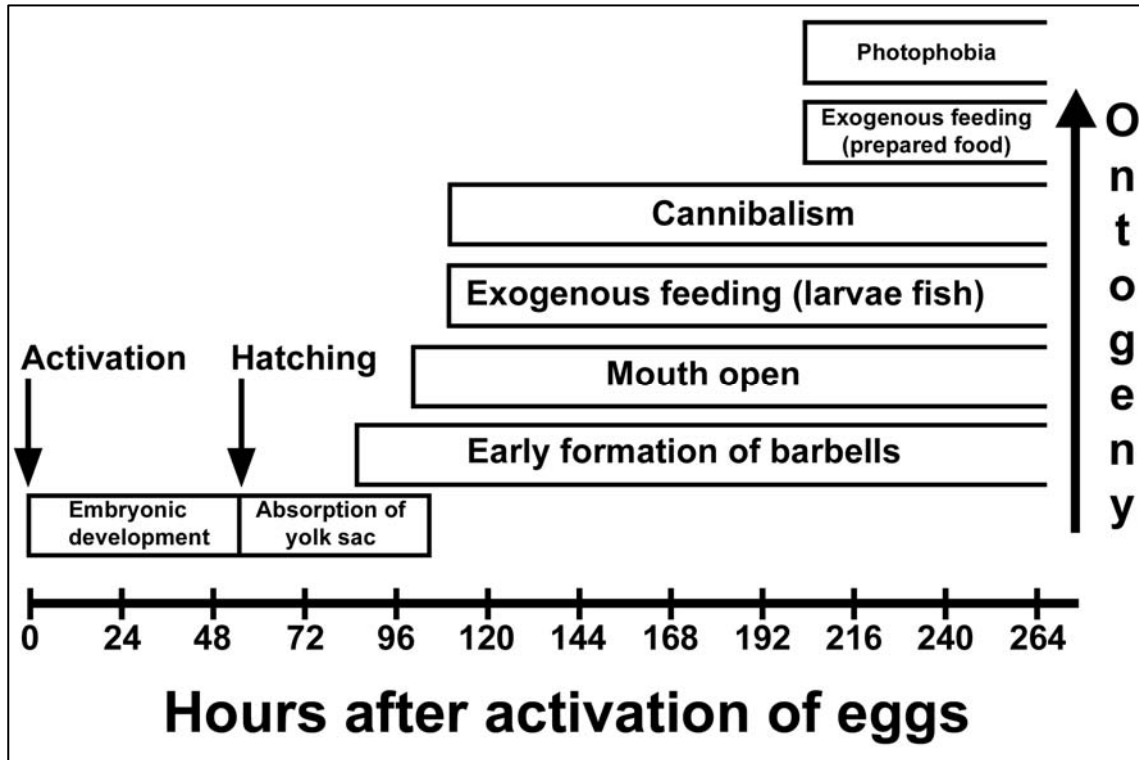
---

embryonic layers, the head (arrowhead) and the tail (14 h 25 min AF); c) complete development and the tail release (arrowhead) (25 h AF); d) hatching (time zero AH) –  $4.30 \pm 0.70$  mm (54 h); e) after hatching, the larvae are still translucent with a non-pigmented body; f) early formation of barbells (arrowhead) (38 h 30 min AH); g) larvae with opened mouth were observed although exogenous feeding had not yet been observed (50 h AH); h) larvae fully developed (all structures) with barbells (arrowhead) (60 h AH). Bars: (a-h) 1 cm.



**Fig. 4** Macroscopic aspects of larval development of *Steindachneridion parahybae*. a, b) detail of cannibalism among the surubim larvae (preyed larvae, arrowhead) (60 h AH); c) exogenous feeding with prepared food (arrowhead) (100 h 57 min AH); d) exogenous feeding of *S. parahybae* (arrow) with *Prochilodus lineatus* larvae (arrowhead) (100 h 57 min AH). Bars: (a-g) 1 cm.

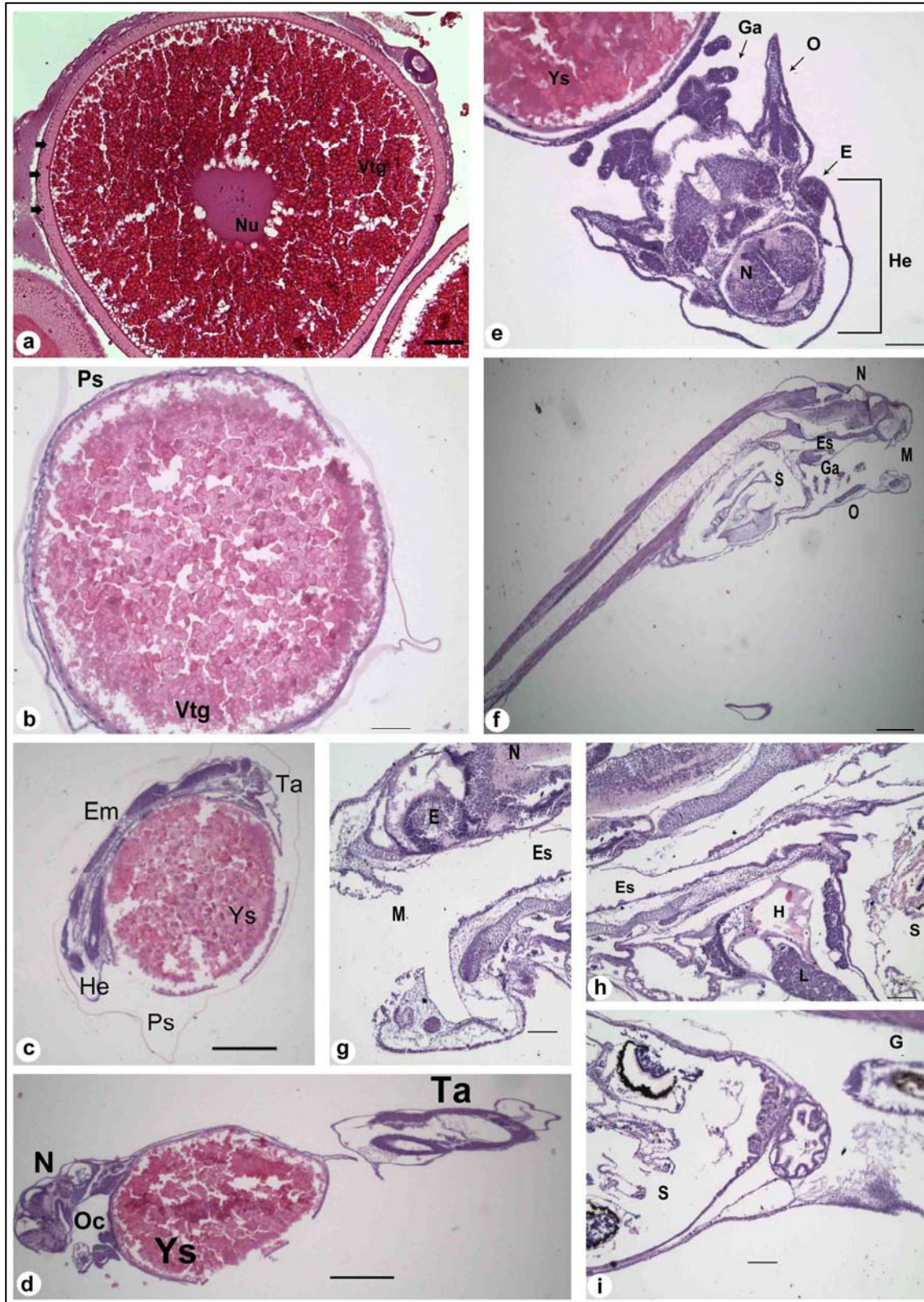




**Fig. 5** *Steindachneridion parahybae*: major events during ontogeny of surubim do Paraíba larvae.

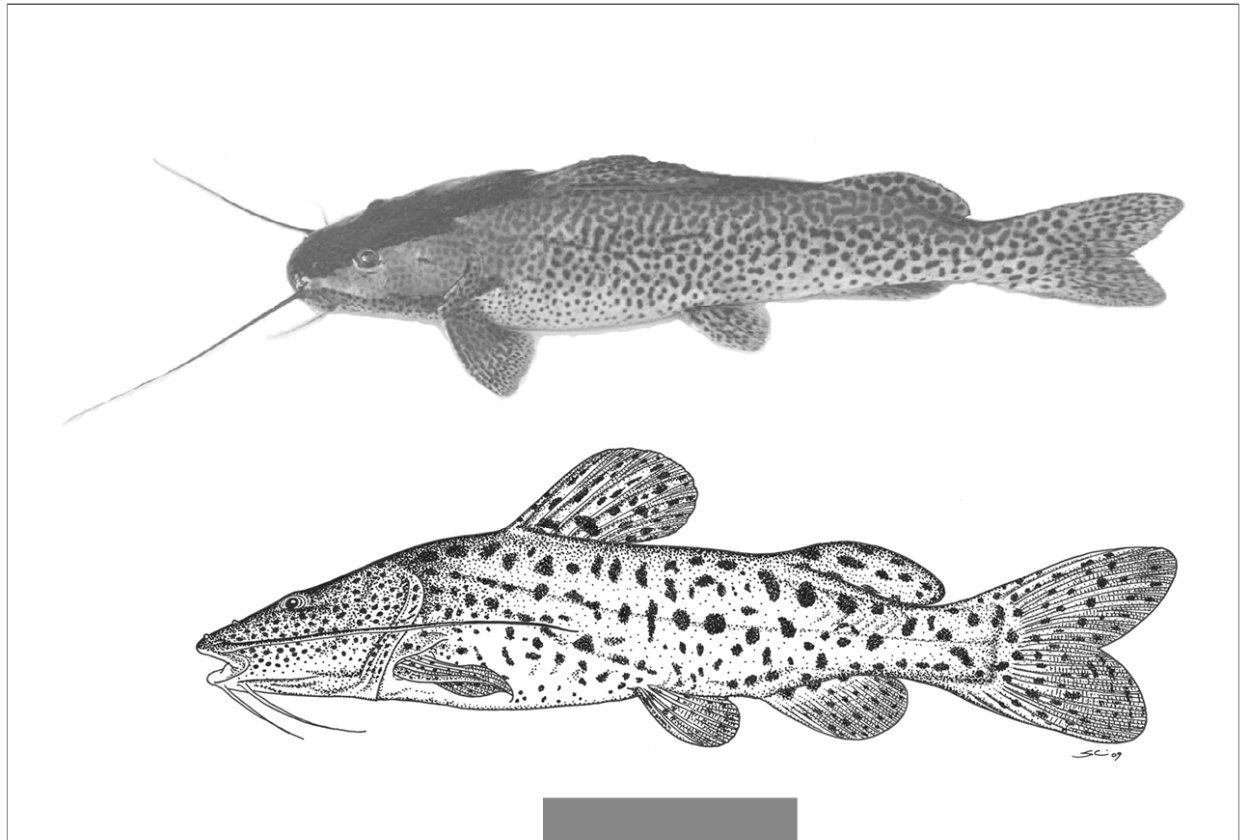






**Fig. 6** Main features of oocytes and the phases of embryonic and larval development of *Steindachneridion parahybae*. a) Oocyte extruded just before the fertilization: showing the follicular layers (arrow), yolk granules (VtG), and nucleus (Nu); b) Egg hydrated,

immediately after spawning and fertilization (time zero AF): showing the yolk granules (VtG) and perivitelline space (Ps); c) Final gastrula and blastopore closure – followed by embryo (Em) differentiation of head (He), tail (Ta) and yolk sac (Ys) inside the perivitelline space (Ps); d) Hatching (time zero AH): showing the neurocranium (N), tail (Ta), yolk sac (Ys), and oral cavity (Oc); e) Detail of the head (He) – showing the main structures of He: neurocranium (N), eyes (E), operculum (O), gill arches (Ga), and yolk sac (Ys); f) Opened mouth (M); g, h, i) the main structures of the larvae were developed: neurocranium (N), gill arches (Ga), stomach (S) esophagus (Es) and operculum (O); g, h, i) Details of the digestive system: eyes (E); esophagus (Es); gut (G); heart (H); liver (L); mouth (M); neurocranium (N); stomach (S). Bars: (a, b, e, g, h, i) 100  $\mu\text{m}$ ; (c, d, f) 400  $\mu\text{m}$ .



# 7

## *CAPÍTULO*

---

Discussão geral

Considerações finais

Perspectivas futuras

Referências bibliográficas

**Eixo hipotálamo-hipófise-gônadas de *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae).**

*Steindachneridion parahybae* é um bagre de tamanho médio, potamódromo (reofílico), ictiófago, e endêmico da bacia do Paraíba do Sul (Garavello, 2005). Esta Bacia é isolada geograficamente, localizada no sudeste do Brasil (20°26' e 23°39'S e 41° e 46°30'W), e na década de 50's, alguns registros de captura desta espécie, em torno de 1000 kg/ano são observados na literatura (Machado & Abreu, 1952), por outro lado, hoje em dia, não há registro de captura desta espécie no Estado de São Paulo (São Paulo, 2008). Eventos como as construções de barragens (principalmente no Rio Paraíba do Sul), que bloqueiam a migração reprodutiva de *S. parahybae* e agem como uma barreira para a sua dispersão; a destruição de seu habitat natural; e o aumento da poluição da água, devido principalmente ao grande desenvolvimento industrial na região, e a pesca predatória, levaram *S. parahybae* à lista de espécies seriamente ameaçada de extinção (Honji et al., 2009).

De acordo com Hilsdorf & Petrere (2002), poucas populações selvagens de *S. parahybae* existem ao norte da Bacia do Paraíba do Sul, e desde 2003, a CESP apóia um programa de repovoamento desta espécie na Bacia, principalmente no Rio Paraíba do Sul (Caneppele et al., 2004; CESP, 2006). O esforço de pescarias não comerciais, financiado pelo programa governamental (ANEEL, 2006), auxilia na captura de reprodutores selvagens e transferência destes para o cativeiro (pisciculturas da CESP). No entanto, a captura de *S. parahybae* no ambiente natural é restrita e relativamente difícil, resultando em um número limitado de espécimes disponíveis para os estudos (Danilo Caneppele, comunicação pessoal<sup>1</sup>), o que torna, a biologia de *S. parahybae* pouco compreendida.

Importantes espécies para a aquicultura comercial mundial, como por exemplo, *Anguilla* spp., *Epinephelus* spp., *Thunnus* spp., *Seriola* spp., entre outras espécies (Ottolenghi et al., 2004), ainda dependem da coleta de reprodutores e juvenis no ambiente natural e, posterior, na transferência para o cativeiro (Mylonas et al., 2010). Todavia, esta passagem dos reprodutores do ambiente natural para o cativeiro é acompanhada por disfunções reprodutivas, ou seja, estes animais não apresentam uma reprodução espontânea, sendo necessária uma manipulação ambiental e/ou hormonal para que estas se reproduzam artificialmente em operações de cultivo (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010), e/ou ainda apresentam, uma baixa qualidade dos gametas (oócitos e espermatozóides) (Brooks et al., 1997; Bobe &

---

<sup>1</sup> Danilo Caneppele – Biólogo responsável pela piscicultura da Companhia Energética de São Paulo (CESP), unidade de Parafbuna, São Paulo (SP), Brasil.

Labbé, 2010; Schulz et al., 2010). Em cativeiro, *S. parahybae* também apresentou disfunções reprodutivas, principalmente as fêmeas quando são submetidas ao sistema de cultivo. Estes animais não apresentaram a maturação final dos oócitos e ovulação, o que justifica a ausência de desova espontânea em cativeiro. Adicionalmente, segundo Caneppele et al. (2009) que reportam pela primeira vez a reprodução de *S. parahybae* de origem selvagem em cativeiro, as fêmeas de surubim do Paraíba liberam uma quantidade inferior de oócitos se comparadas a outras espécies de Siluriformes.

Dentro deste contexto, quando *S. parahybae* está em condições de cultivo em cativeiro, além de apresentar uma disfunção reprodutiva (bloqueio na maturação final, ovulação e desova), estes animais aparentemente apresentam uma baixa quantidade e/ou qualidade nos gametas. Estes fatos ressaltam a importância de aumentar o conhecimento sobre os processos neurais e hormonais que controlam a atividade reprodutiva desta espécie, principalmente em relação ao eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (H-H-G) em fêmeas, que foi aqui investigado.

Nossos estudos demonstram claramente que no sistema encefálico de *S. parahybae* são encontradas duas diferentes formas de GnRH, a forma *catfish* GnRH (cfGnRH) e a forma *chicken-II* GnRH (cGnRH-II). A distribuição de neurônios de cfGnRH foi identificada em toda região ventral do telencéfalo e nas principais áreas do diencéfalo e os neurônios de cGnRH-II foram observados na região do tegumento do cérebro médio, próximo ao terceiro ventrículo, eventualmente associados aos vasos sanguíneos. Adicionalmente, escassos e pequenos neurônios imunoreativos (ir) dispersos na região anterior do telencéfalo ventral foram identificados, ao contrário dos maiores e numerosos neurônios-ir observados na região posterior, principalmente no hipotálamo médio basal. Além disso, os neurônios de cfGnRH estão intimamente relacionados com a modulação da atividade da hipófise, que ao contrário dos neurônios de cGnRH-II (que não inervam a glândula hipofisária), provavelmente estão relacionados com a neuromodulação e/ou comportamento reprodutivo em *S. parahybae*. Do mesmo modo, os nossos resultados mostram alterações dos neurônios-ir de cfGnRH durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução em cativeiro, sugerindo que o insucesso na reprodução em cativeiro seja devido a alguma disfunção endócrina desta forma de GnRH, especialmente pela modulação do GnRH na síntese e/ou liberação de gonadotropinas (GtHs), principalmente do hormônio luteinizante (LH).

No que tange as células hipofisárias de *S. parahybae*, os nossos resultados caracterizaram as diferentes células da adeno-hipófise e forneceram uma base para futuros estudos sobre o controle hormonal de diferentes processos fisiológicos e comportamentais em

teleósteos Neotropicais, mais especificamente nos bagres. Considerando que ambas as gonadotropinas, FSH (hormônio folículo estimulante) e LH, possuem um papel significativo na regulação da maturação ovariana em *S. parahybae*, e a disfunção reprodutiva desta espécie em cativeiro ocorre na maturação final e ovulação, mais uma vez, esta disfunção é provavelmente devido a uma falha no estímulo da síntese e/ou liberação de LH. As análises histológicas dos ovários, adicionadas às análises das GtHs, permitem concluir que durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae* os oócitos desta espécie, mesmo em condições de cultivo, apresentam um crescimento primário e secundário satisfatórios, ou seja, indicando que o FSH provavelmente foi sintetizado e liberado de forma suficiente para promover a vitelogênese. Além disso, as variações observadas nos hormônios da família do hormônio de crescimento, hormônio de crescimento (GH), prolactina (PRL) e somatolactina (SL) durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae*, sugerem que estes hormônios estão envolvidos indiretamente nos processos reprodutivos e pode ter um papel fisiológico na regulação e/ou na modulação de mecanismos associados à reprodução, ou seja, no *status* reprodutivo do surubim do Paraíba.

Os perfis plasmáticos de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) e testosterona (T) durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae* apresentaram papéis fundamentais no desenvolvimento oocitário e parece que estes esteróides sexuais não estão envolvidos no bloqueio da reprodução em espécies migradoras de teleósteos quando submetidos ao cativeiro. Por outro lado, os valores de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona ( $17\alpha$ -OHP) durante o ciclo reprodutivo e após a indução à reprodução, sugerem que a falha na maturação final, ovulação e desova esteja relacionada com uma disfunção nos progestágenos, principalmente no *17\alpha, 20\beta*-dihydroxy-4-pregnen-3-one (MIS). Desta forma, o desenvolvimento de protocolos de imunoenaios para o MIS, para espécies reofílicas pode ser uma ferramenta valiosa para o entendimento desta (s) disfunção (ões) da reprodução. Adicionalmente, a concentração do andrógeno 11-cetotestosterona (11-KT) em *S. parahybae* variou durante o ciclo reprodutivo, com maior valor no estágio vitelogênico e nas fêmeas induzidas à reprodução, sugerindo um envolvimento deste esteróide durante a reprodução do surubim do Paraíba. No entanto, o sítio de síntese (provavelmente nas células foliculares), o sítio de ação e a (s) possível (is) função (ões) ainda permanece (m) desconhecido (s).

Dentro deste contexto, o FSH durante o ciclo reprodutivo de *S. parahybae* aparentemente apresentou um perfil de síntese e liberação de forma satisfatória, uma vez que, o FSH estimulou a síntese e liberação  $E_2$  de forma suficiente para promover a vitelogênese no surubim do Paraíba, que foi constatado também nos ovários, pois foi identificada a presença

de vários oócitos vitelogênicos. No entanto, os nossos estudos identificaram uma falha na maturação final, ovulação e desova em *S. parahybae* quando as fêmeas sofrem condições de cultivo, provavelmente devido a uma disfunção no MIS. Este progestágeno é modulado pelo LH e nossos resultados indicam que o LH, nos animais no estágio vitelogênico não foi sintetizado e/ou liberado de forma satisfatória para induzir a conversão de  $17\alpha$ -OHP em MIS. Por outro lado, os nossos dados (análise semiquantitativa) sugerem que o cfGnRH, responsável pela modulação de LH, é sintetizado no estágio vitelogênico, mas diminui nos animais induzidos à reprodução, indicando que o cfGnRH não foi sintetizado/liberado em quantidade suficiente.

Em síntese, esses dados fornecem subsídios para o aperfeiçoamento do método de reprodução induzida do surubim do Paraíba em pisciculturas de conservação, contribuindo assim para um melhor desempenho reprodutivo dessa espécie em cativeiro, o que auxiliará no programa de repovoamento da Bacia do Rio Paraíba do Sul e seus tributários. Além disso, o conhecimento do desenvolvimento embrionário da espécie será importante como base para que o manejo durante a fase larval seja aperfeiçoado, principalmente considerando-se a cronologia dos principais eventos que influenciam na sobrevivência das larvas de peixes carnívoros, como o fechamento do bastóporo, reabsorção do saco vitelínico e abertura da boca. Adicionalmente, o completo entendimento do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, assim como as enzimas envolvidas nas vias esteroidogênicas, *i.e.*,  $20\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase; e outros componentes que podem interferir (estimulando e/ou inibindo) este eixo, como por exemplo, melatonina, *kisspeptina*, dopamina, entre outros neuromoduladores e neurotransmissores, podem auxiliar nos protocolos de indução artificial à reprodução, processo essencial na piscicultura de conservação, inclusive para *S. parahybae*.

### Referências bibliográficas

- ANEEL. 2006. Formação de um banco de germoplasma da ictiofauna ameaçada da Bacia do Rio Paraíba do Sul. ANEEL (0061-017/2006).
- Bobe, J. & Labbé, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165: 535-548.
- Brooks, S.; Tyler, C. R. & Sumpter, J. P. 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Rev. Fish Biol. Fisher.* 7: 387-416.

- Caneppele, D.; Honji, R. M.; Hilsdorf, A. W. & Moreira, R. G. 2009. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). Neotropic. Ichthyol. 7(4): 759-762.
- Caneppele, D.; Oliveira, J. A. C.; Rosa, M. M. & Barros, B. P. P. 2004. Tecnologia de reprodução induzida aplicada à preservação do surubim do Paraíba. XIII Simpósio Brasileiro de Aquicultura. SIMBRAq. Fortaleza, Brasil. p287
- CESP (Companhia Energética de São Paulo). 2006. 40 Peixes do Brasil. CESP 40 anos. Rio de Janeiro, Doiis, 208p.
- Garavello, J. C. 2005. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). Neotropic. Ichthyol. 3(4): 607-623.
- Hilsdorf, A. W. S. & Petrere, M. 2002. Peixes da bacia do Rio Paraíba do Sul: aspectos de sua diversidade e conservação. Ciência Hoje 30(180): 62-65.
- Honji, R. M.; Caneppele, D.; Hilsdorf, A. W. S. & Moreira, R. G. 2009. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). Environ. Biol. Fish. 85(3): 207-208.
- Machado, C. E. & Abreu, H. C. F. 1952. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo-1. A pesca no Vale do Paraíba. Boletim da Indústria Animal de São Paulo. 13: 145-160.
- Mylonas, C. C.; Fostier, A. & Zanuy, S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. Gen. Comp. Endocrinol. 165: 516-534.
- Ottolenghi, F.; Silvestri, C.; Giordano, P.; Lovatelli, A. & New, M. B. 2004. Capture-based aquaculture. The fattening of eels, groupers, tunas and yellowtails. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 308p.
- São Paulo. 2008. Decreto Estadual no. 53494 - 2008 de 02 de outubro de 2008. Diário Oficial do Estado de São Paulo 118(187). Secretaria do Meio Ambiente.
- Schulz, R. W.; França, L. R.; Lareyre, J.; LeGac, F.; Chiarini-Garcia, H.; Nóbrega, R. H. & Miura, T. 2010. Spermatogenesis in fish. Gen. Comp. Endocrinol. 165: 390-411.
- Zohar, Y. & Mylonas, C. C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture 197: 99-136.