GABRIELA BRAMBILA DE SOUZA

**Biologia reprodutiva de fêmeas de *Astyanax fasciatus* com
números de cromossomos diferentes vivendo em ambiente
natural e no cativeiro.**

“Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* females with different
chromosome numbers living in natural environment and in captivity”.

Versão corrigida

São Paulo

2014

GABRIELA BRAMBILA DE SOUZA

**Biologia reprodutiva de fêmeas de *Astyanax fasciatus* com
números de cromossomos diferentes vivendo em ambiente
natural e no cativeiro.**

“Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* females with different
chromosome numbers living in natural environment and in captivity”.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de mestre em
Ciências na área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira-Whitton

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Brambila-Souza, G.

Biologia reprodutiva de fêmeas de *Astyanax fasciatus* com números de cromossomos diferentes vivendo em ambiente natural e no cativeiro.

Gabriela Brambila de Souza; Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton – São Paulo, 2014.47pág.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. *Astyanax*, 2.cativeiro, 3.estradiol, 4.fecundidade, 5.número de cromossomos, 6.reprodução. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Renata G.MoreiraWhitton
*Universidade de São Paulo – Instituto de
Biociências*

Não estejais ansiosos quanto a vossa vida, pelo que haveis de comer ou pelo que haveis de beber, nem quanto ao vosso corpo, pelo que haveis de vestir. Não é a vida mais do que o alimento e corpo mais do que o vestuário?

Não vos inquieteis, pois, pelo dia de amanhã. Mas busque primeiro o reino de Deus e todas estas coisas vos serão acrescentadas.

*Jesus Cristo
Mateus 6. 25-33*

Dedico

-Aos meus pais pela dedicação e esforço desempenhado, e por entender meus propósitos de vida e me deixar caminhar sozinha, mas sempre olhando de perto para me ajudar nos tropeços.

-Ao meu irmão pelo apoio e amor.

-Ao meu marido André Ochiulini Silva por todo, amor, paciência, companheirismo e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar os meus mais sinceros e profundos agradecimentos a todos que diretamente ou indiretamente colaboraram e apoiaram na finalização deste trabalho.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pois senti sua presença em cada etapa desse trabalho, desde o exame de ingresso até esse momento e sei que ele está sempre me amparando e protegendo em todos os momentos, mesmo muitas vezes sem o meu merecimento.

À Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton, por ter confiado em mim para fazer parte de sua equipe, e ser um exemplo de bom profissional e líder, me deixando andar sempre ao seu lado, mas sempre me orientando da melhor forma possível para não errar, ou caso errasse, a enfrentar meus erros. Mas muito além do lado profissional que é excelente, esteve muito presente em minha vida particular sempre me aconselhando em momentos difíceis e comemorando comigo em momentos alegres. Obrigada Re por ser essa pessoa tão generosa a quem eu aprendi a respeitar e a amar.

Ao meu amor André Ochiulini Silva, meu marido e companheiro em todos os momentos, pelo amor e dedicação a mim e às minhas escolhas. Pela paciência nos momentos difíceis e pelas palavras de encorajamento quando necessário.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf, da Universidade de Mogi das Cruzes pelo o auxílio na elaboração desse estudo.

Ao pescador Milton Nunes Santana pela grande colaboração desde o início desse trabalho nos auxiliando com a captura dos animais e auxílio nas coletas. E dividindo conosco sua grande experiência com o dia-a-dia da pesca.

À Dra. Aline Dal'Olio Gomes e ao Dr. Renato Massaaki Honji pelas discussões sobre esse trabalho e pela paciência em me socorrer sempre quando necessário. Vocês foram muito mais do que colaboradores, tornaram-se grandes amigos, obrigada.

Um agradecimento especial às equipes de coletas que formamos, com os fixos Aline Dal'Olio Gomes e Carlos Eduardo Tolussi e os demais Andreone Medrado, Vagner Alberto, Raisa Pereira Abdala, Cristiele Ribeiro, Bianca Kida, Thiago Silva e Vanessa Vieira a quem devo toda mão de obra do meu trabalho e com quem pude aprender muito.

Aos professores do Departamento de Fisiologia do IB/USP pelas disciplinas ministradas, conversas e discussão extraoficiais, bem como a todos professores de outras unidade ou departamentos.

A todos os funcionários do Instituto de Biociências pelos serviços competentes prestados, por toda amizade e ajuda prestadas.

Aos meus queridos amigos do LAMEROA (Aline Dal'Olio Gomes, Amanda Narcizo, Andreone Medrado, Bianca Kida, Bruno Cavalheiro, Cristiéle Ribeiro, Elena Galvanese, Carlos Eduardo Tolussi, Carlos Eduardo Garcia, Jandyr Rodrigues Filho, Jéssica Teske, Mariana Frias, Paulo Mello, Raísa Abdalla, Renato Honji, Roberta Ferrari, Tiago Gabriel, Thiago Silva, Vanessa Vieira, Walquíria Parreira e aos agregados), que com certeza fizeram a diferença nesse tempo em que trabalhamos e nos divertimos juntos. Sem vocês tudo com certeza seria mais difícil. Muito obrigada pelas risadas, descontrações, mas também principalmente pelo apoio nas horas difíceis. Cada um com seu jeito, uns mais amáveis outros mais brutos, uns sensatos e outros totalmente sem noção. Vocês certamente tem responsabilidade na minha formação como mestre e como pessoa. Aprendi a amar muitos de vocês e a respeitar as diferenças entre nós. Obrigada, amo vocês.

As grandes amigas que fiz Bianca Kida e Raisa Pereira Abdalla, que mesmo tomando escolhas de vida diferente da minha com certeza essa amizade será para a vida inteira, meninas dedicadas ao trabalho e muito parceiras na hora do lazer. Muito obrigada por fazerem a minha vida mais alegre.

E aqueles que muitas vezes sem entender plenamente minhas escolhas estavam lá me apoiando integralmente:

Aos meus pais e irmão, mesmo que muitas vezes não concordando e não entendendo plenamente a vida que escolhi me deram todo amor, apoio, suporte emocional e às vezes até financeiro para a concretização dos MEUS sonhos e planos. Sinto que posso contar com vocês em qualquer escolha que faço e sei que sempre serão meu suporte, mesmo que eu tropece não me deixarão cair. Amo muito vocês.

A minha sogra, meus cunhados e cunhadas que hoje mais do que nunca fazem parte da minha vida e me garantiram muito amor e diversão durante esse tempo.

Ao meu pastor e amigos da IPVE, que sempre compartilham comigo meus sonhos e estão sempre por perto para comemorar minhas conquistas e agradecer a Deus junto comigo por elas.

Muito obrigada!

Gabrela Brambila de Souza

ÍNDICE

Lista de abreviações	i
Lista de tabelas	i
Lista de figuras	ii
Lista de anexos	v
Resumo	vi
Abstract	viii
1. Introdução	1
1.1 Modulação do meio ambiente	1
1.2 Ação endócrina	1
1.3 Esteroidogênese gonadal	12
1.4 Estratégia reprodutiva	3
1.5 Ações antrópicas	4
1.6 <i>Astyanax fasciatus</i>	6
2. Objetivos	8
2.1 Gerais	8
2.2 Específicos	8
3. Materiais e métodos	8
3.1 Delineamento experimental	8
3.2 Determinação da fecundidade e diâmetro dos oócitos	11
3.3 Caracterização histológica das gônadas	13
3.4 Concentração de 17 β -estradiol (E2) plasmático	14
4. Resultados	15
4.1 Dados biométricos	15
4.2 Índice gonadossomático – IGS	15
4.3 Fecundidade	17
4.3.1 Fecundidade absoluta	17
4.3.2 Fecundidade relativa	19
4.4 Frequência dos diâmetros oocitários	21
4.4.1 Padrão de frequência dos diâmetros oocitários ao longo do ano	21
4.4.2 Oócitos vitelogênicos	22
4.4.3 Oócitos residuais	24
4.5 Concentração de E2 plasmático	25

4.6 Análises histológicas	27
5. Discussão	35
5.1 Perfil reprodutivo de <i>Astyanax fasciatus</i> com n=46	35
5.2 Perfil reprodutivo de <i>Astyanax fasciatus</i> com n=48	36
5.3 Comparação descritiva do perfil reprodutivo de <i>A. fasciatus</i> com números de cromossomos diferentes (n=46 e n=48)	38
6. Considerações finais	39
7. Referências bibliográficas	40
8. Anexos	45

LISTA DE ABREVIações

---

17 α OHP: 17 α -hidroxiprogesterona

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

AN: Ambiente natural

Cat: cativo

E2: estradiol

FA: fecundidade absoluta

FR: fecundidade relativa

FSH: Hormônio folículo estimulante

G1: grupo 1 - *Astyanax fasciatus* com 46 cromossomos

G2 grupo 2 - *Astyanax fasciatus* com 48 cromossomos

GnRH: Hormônio Liberador de gonadotropina

IGS: Índice gonadosomático

LH: Hormônio luteinizante

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Classificação do estágio de maturação ovariano baseado nas fases do desenvolvimento dos oócitos de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G1 (2n=46).

Tabela2: Classificação do estágio de maturação ovariano baseado nas fases do desenvolvimento do oócito de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G2 (2n=48).

LISTA DE FIGURAS

Figura1: Piscicultura da Barragem de Ponte Nova (a), Bacia do Alto Tietê e tributários (b).

Figura 2: *Astyanax fasciatus*. Biometria do grupo experimental 1, coletado na Bacia do Alto Tietê.

Figura 3: *Astyanax fasciatus*. Biometria do grupo experimental 2 coletado na Bacia do Alto Tietê.

Figura 4: *Astyanax fasciatus*. Punção de sangue do grupo experimental 1.

Figura 5: *Astyanax fasciatus* pesagem (g) dos animais G1 (a) e G2(b).

Figura 6: pesagem (g) dos Ovários: G1Cat (a), G1 AN (b), G2 Cat (c) e G2 AN (d).

Figura 7: Pipeta Stempel utilizada para retirada de 2ml do homogeneizado de etanol 70% com oócitos (a). Placa de acrílico para contagem dos oócitos (b). Imagens dos oócitos (c), medida dos oócitos em μm (d).

Figura 8: Massa corpórea (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* dos grupos G1 (2n=46) e G2 (2n=48) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano (n=24). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P<0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P<0,05$).

Figura 9: Índice gonadossomático (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G1 (2n=46) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P<0,05$). Barras

com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

Figura 10: Índice gonadossomático (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G2 (2n=48) coletadas no ambiente natural (AN) e cativo (Cat) ao longo de um ano (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

Figura 11: Fecundidade absoluta (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G1 (2n=46) coletadas no ambiente natural (AN) e cativo (Cat) ao longo de um ano (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

Figura 12: Fecundidade absoluta (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G2 (2n=48) coletadas no ambiente natural (AN) e cativo (Cat) ao longo de um ano (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

Figura 13: Fecundidade relativa (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G1 (2n=46) coletadas no ambiente natural (AN) e cativo (Cat) ao longo de um ano (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

Figura 14: Fecundidade Relativa (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G2 (2n=48) coletadas no ambiente natural (AN) e cativo (Cat) ao longo de um ano (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatística

entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

Figura 15: Frequência de diâmetros oocitários (médias) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* dos grupos G1 ($2n=46$) e G2 ($2n=48$) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano ($n=6$). As cores diferentes representam as estações do ano.

Figura 16: Porcentagem dos oócitos vitelogênicos (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G1 ($2n=48$) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano ($n=6$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

Figura 17: Porcentagem dos oócitos vitelogênicos (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G2 ($2n=48$) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano ($n=6$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

Figura 18: Porcentagem dos oócitos residuais (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G1 ($2n=46$) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano ($n=6$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

Figura 19: Porcentagem dos oócitos residuais (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G2 ($2n=48$) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano ($n=6$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente

($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

Figura 20: Concentração plasmática de estradiol (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G1 (2n=46) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

Figura 21: Concentração plasmática de estradiol (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G2 (2n=48) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

Figura 22: Secção de ovário de *Astyanax fasciatus* com 46 cromossomos (G1) em ambiente natural na primavera (a), no verão (c), no outono (e) e no inverno (g). Secção de ovário de *Astyanax fasciatus* com 46 cromossomos (G1) em cativeiro na primavera (b), no verão (d), no outono (f) e no inverno (h). PN: perinucleolar; CA: cortical alveolar; V: vitelogênico; A: atrésico; POF: Folículo pós ovulatório.

Figura 23: Secção de ovário de *Astyanax fasciatus* com 48 cromossomos (G2) em ambiente natural na primavera (a), no verão (c), no outono (e) e no inverno (g). Secção de ovário de *Astyanax fasciatus* com 48 cromossomos (G2) em cativeiro na primavera (b), no verão (d), no outono (f) e no inverno (h). PN: perinucleolar; CA: cortical alveolar; V: vitelogênico; A: atrésico; POF: Folículo pós ovulatório.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Processamento histológico

Anexo 2: Instruções do fabricante quanto à utilização dos kits de estradiol

RESUMO

Ações antrópicas, como a construção de reservatórios, alteraram a migração de peixes que afeta a função normal do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Para atenuar o impacto ambiental sobre a biota, existem programas de repovoamento com objetivo de reproduzir as espécies de peixes atingidas pelas barragens. Na piscicultura de Ponte Nova, na Bacia do Alto Tietê, o peixe migratório *Astyanax fasciatus* é rotineiramente produzido para o repovoamento com protocolos de reprodução artificial convencionais, mas o seu sucesso varia entre as fêmeas. Um estudo de citogenética detectou que o número de cromossomos foi diferente entre os reprodutores, uma característica comum em *A. fasciatus*. O objetivo do presente estudo foi estudar a fisiologia reprodutiva de *Astyanax fasciatus* com diferentes números de cromossomos, em ambiente natural (AN) e em cativeiro (Cat) e as possíveis alterações que possam explicar diferentes resultados de resposta à reprodução induzida em cativeiro. Fêmeas adultas de cada grupo experimental (G1-46 cromossomos; com baixa resposta à reprodução induzida; e G2 - 48 cromossomos; com boa resposta à reprodução induzida) foram coletadas em Cat e em AN ao longo de um ano. Amostras de sangue foram retiradas para análise plasmática de estradiol (E2), e os ovários para o cálculo da fecundidade relativa (FR), diâmetro oocitários, Índice Gonadossomático (IGS) e análises histológicas para identificação do estágio de maturação. As fêmeas do G1 nos dois ambientes iniciaram a fase vitelogênica do ciclo reprodutivo no inverno com o aumento da concentração de E2 plasmático. Nas fêmeas de AN, neste mesmo grupo, a maior porcentagem de oócitos vitelogênicos foi mantida nos ovários desde a primavera até o verão, período no qual a concentração de E2 continuou elevada no plasma. Por outro lado, no Cat, as concentrações de E2 não se mantiveram elevadas nas demais estações do ano, limitando-se apenas ao pico do inverno. Mesmo assim, as fêmeas confinadas mantiveram a FR significativamente mais elevada quando comparadas àquelas de AN, assim como maiores porcentagens de oócitos vitelogênicos, evidenciando a ausência de desova e lentidão no processo de reabsorção do vitelo. Já as fêmeas do G2, em AN iniciaram a fase vitelogênica do seu ciclo reprodutivo no outono, com o

aumento progressivo dos níveis de E2 que atingiram seu pico na primavera, com a desova ocorrendo no verão. Por outro lado, a permanência no Cat, de alguma forma, alterou a sensibilidade às dicas ambientais do ciclo sazonal, e os níveis de E2 e a FR se mantiveram altos praticamente o ano todo. Estes dados sugerem que *A. fasciatus* com números diferentes de cromossomos têm padrões reprodutivos diferentes tanto em Cat como em AN e que em cativeiro fêmeas do G1 terão maior sucesso na indução quando manipuladas logo após o inverno, já fêmeas do G2 em Cat parecem ter sucesso na indução praticamente o ano todo.

Palavras chave: *Astyanax*, cativeiro, estradiol, fecundidade, número de cromossomos, reprodução.

ABSTRACT

Anthropic actions, such as the construction of reservoirs, alter fish migration affecting the normal function of the brain-pituitary-gonads axis. To mitigate the environmental impact on the biota, fish restocking programs aim to reproduce fish species affected by dams. In the Ponte Nova Fish Farm, in the Upper Tietê River Basin, the migratory fish *Astyanax fasciatus* is routinely produced for restocking with a conventional artificial breeding protocol, but its success varies among the females. A cytogenetic study detected that the number of chromosomes was different among the broodstocks, a common feature in *A. fasciatus*. The purpose of this study was to study the reproductive physiology of *Astyanax fasciatus* with different numbers of chromosomes in a natural environment (AN) and captivity (Cat) and the possible changes that might explain different results in the success of induced reproduction in captivity. Adult females of each experimental group (G1-46 chromosomes; with low response to induced reproduction, and G2 - 48 chromosomes, with good response to induced reproduction) were collected in Cat and AN over one year. Blood samples were taken to analyze plasma estradiol (E_2), and samples of ovaries to calculate the relative fecundity (FR), oocyte diameter, gonadosomatic index (GSI) and histological analyzes to identify the maturation stage. Females of G1, in both environments, started the vitellogenic phase of the reproductive cycle in the winter, with an increase in E_2 levels. In the wild animals, the highest percentage of vitellogenic oocytes was maintained in the ovaries from spring to summer, a period in which E_2 levels remained high. On the other hand, in captivity, a higher level of E_2 was observed only in winter. Even so, the females in captivity maintained the fecundity significantly higher when compared with the wild ones, and also a higher percentage of vitellogenic oocytes, evidencing the absence of spawning and a delay in the yolk absorption. In G2, the vitellogenic stage of oocytes in wild females started in the fall, with a progressive increase in E_2 levels, reaching its peak in spring, with the spawning in summer. On the other hand, remaining in the captivity, somehow altered the availability to the environmental tips of the seasonal cycle, and E_2 levels as well as the FR virtually remained high throughout the year. These data suggest that *A.*

fasciatus with different numbers of chromosomes have different reproductive patterns, both in a Cat and AN. G1 females could succeed in induced reproduction when handled immediately after winter, while G2 females seem to succeed the artificial reproductive induction throughout the year.

Keywords: *Astyanax* , captivity, estradiol, fecundity, chromosome numbers, reproduction.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Modulação do meio ambiente

A reprodução em teleósteos é modulada por estímulos ambientais, tais como, fotoperíodo, temperatura, qualidade da água, pluviosidade e alterações nos níveis da água, variações estas que são percebidas através de órgãos sensoriais e transduzidas pelo sistema nervoso, que por sua vez controla o sistema endócrino (Migaud *et al.*, 2010). O processo reprodutivo em teleósteos é sazonal, o que significa que ocorre sempre na mesma época do ano, que pode ser diferente para cada espécie. Uma maior garantia de sobrevivência da prole ocorre quando existe uma sincronização entre as variáveis ambientais adequadas para cada espécie, o desenvolvimento gonadal e a desova (Baldisserotto, 2002; Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007). Assim, em sua maioria, em espécies de clima temperado e latitudes mais elevadas a reprodução se dá quando as temperaturas e comprimento dos dias estão aumentando ou seja, na primavera, enquanto que nos peixes tropicais e subtropicais o período reprodutivo parece estar relacionado com o aumento da pluviosidade ou ainda movimentos sazonais nas correntes oceânicas (Bromage *et al.*, 2001). Como a maturação gonadal exige um tempo para ocorrer a ponto dos oócitos estarem prontos para ovulação, fica claro que este processo se inicia antes e são dependentes de alguns sinais ambientais anteriores às mudanças na qualidade da água, e se acredita que, ao menos nas espécies de clima temperado, esta pista é o fotoperíodo, com sua mudança gradativa ao longo das estações do ano (Bromage *et al.*, 2001).

1.2 Ação endócrina

Apesar da reprodução em teleósteos ser modulada por estímulos externos, endogenamente é controlada pelo sistema neuroendócrino, mediado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Os estímulos ambientais captados por receptores sensoriais são transduzidos pelo sistema nervoso e estimulam o hipotálamo a sintetizar e liberar um neuro-hormônio chamado hormônio liberador das gonadotropinas (GnRH), que por sua vez estimulam as células gonadotrópicas localizadas na adeno-hipófise a sintetizar e liberar as gonadotropinas, chamadas de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio

luteinizante (LH). Via corrente sanguínea o FSH e o LH atingem as gônadas e estimulam a produção dos hormônios esteroides gonadais (Bombardelli *et al.*, 2006). Além do GnRH, outros fatores como a dopamina e o hormônio inibidor de gonadotropinas (GnIH) também modulam a síntese de gonadotropinas hipofisárias, neste caso inibindo a liberação destas gonadotropinas (Zohar *et al.*, 2010).

Em fêmeas, o FSH age nas células da teca do folículo ovariano, estimulando as mesmas a captar o colesterol e convertê-lo em testosterona. Este andrógeno é transportado até as células foliculares onde atua a enzima aromatase que converte a testosterona em 17β -estradiol, principal estrógeno nos vertebrados (Baldisserotto, 2002). O 17β -estradiol, por sua vez age no fígado, estimulando a síntese de vitelogenina, uma glicolipofosfoproteína, que promove o crescimento do oócito devido à incorporação de vitelo (processo também mediado pelo FSH), que posteriormente será utilizado para nutrição inicial das larvas (Lowe-Mcconnel, 1999). Na maioria das espécies de peixes estudadas até o momento, ainda na fase de vitelogênese, ocorre um aumento nos níveis plasmáticos de 17β -estradiol e testosterona, e esse aumento inibe a síntese de FSH, pelo processo conhecido como feedback negativo, e estimula junto com a ação do GnRH a secreção de LH nas fases finais da vitelogênese (Swanson *et al.*, 2003). O LH estimula as células da teca a produzir o progestágeno 17α -hidroxiprogesterona (17α OHP), que é transportado até as células foliculares e convertido a 17α - 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17α 20β DHP), principal progestágeno responsável pela maturação final dos oócitos e ovulação na maioria dos teleósteos (Melamed *et al.*, 1998; Swanson *et al.*, 2003).

1.3 Esteroidogênese gonadal

O termo químico esteroide refere-se a uma variedade de compostos lipídicos que possuem quatro anéis de carbono conhecido como: anel ciclopentanoperidrofenantreno ou núcleo esteroide. O precursor dos esteroides é a molécula de colesterol que pode ser ingerido na dieta ou sintetizado endogenamente no fígado. Os hormônios esteroides podem ser divididos em três subgrupos, os mineralocorticoides que são envolvidos no controle do balanço hídrico, os glicocorticoides que modulam o balanço energético e o

sistema imune e os esteroides sexuais que tem papel fundamental na reprodução e diferenciação de caracteres sexuais, papel este que é o foco deste trabalho (Nelson e Cox, 2002).

Como já foi mencionado, o precursor da via de síntese dos esteroides é o colesterol formado por 27 carbonos e que será convertido em progestágenos com 21 carbonos, e este por sua vez será convertido em andrógenos com 19 carbonos e por fim em estrógenos, com 18 carbonos. Essas conversões ocorrem através de ação de enzimas, principalmente aquelas pertencentes ao complexo P450; primeiro o colesterol sofre ação da P450scc (*side chain cleavage*) que cliva toda sua cadeia lateral, retirando 6 carbonos, então sendo nomeada de pregnenolona que tem 21 carbonos. A pregnenolona sofre ação da P450c17 (*steroid 17 alpha-hydroxylase*) que é responsável por inserir uma hidroxila no carbono 17, transformando a pregnenolona em 17 alfa hidroxipregnenolona. A pregnenolona também pode sofrer ação da 3 beta HSD (*3- β -hydroxysteroid dehydrogenase*) que acrescenta um oxigênio no carbono 3, convertendo-a em progesterona, que pode também sofrer a ação da enzima P450 c 17 e ser convertida em 17 alfa hidroxipregnenolona. (Nelson e Cox, 2002).

A partir dos progestágenos há a formação de andrógenos. Estes andrógenos também podem sofrer ações enzimáticas se diferenciando em outros andrógenos, ou ainda podem sofrer ação da P450 aromatase que vai aromatizar a molécula de testosterona, transformando-a em estradiol. Os pontos da esteroideogênese aqui detalhados deixam claro que tanto machos quanto fêmeas sintetizam todos os esteroides, pois têm as enzimas responsáveis por convertê-los, o que os diferencia é a concentração que é maior em um ou em outro sexo (Norris, 1997; Lubzens *et al.*, 2010). Enquanto a síntese de esteroides gonadais ovarianos ocorre nas células foliculares, nos machos o principal local de produção destes hormônios é nas células de Leydig testiculares.

1.4 Estratégia reprodutiva

Os estudos da biologia reprodutiva dos peixes mostram que a maioria das espécies tropicais se reproduz sazonalmente várias vezes durante a vida, com variações devido às diferenças no desenvolvimento oocitário entre as

espécies (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007). Este desenvolvimento pode ser dividido em três padrões: sincrônico, sincrônico em grupos e assincrônico (Vazzoler, 1996; Baldisserotto, 2002). O padrão de desenvolvimento oocitário do tipo sincrônico é o menos usual na reprodução dos teleósteos e sem representantes na fauna íctia tropical, pois todos os oócitos maturam em um único grupo e são ovulados juntos, apenas uma vez na vida, culminando com a morte do animal, o que ocorre com o salmão migratório do Pacífico (*Onchorhynchus kisutch*) (Baldisserotto, 2002). No padrão de desenvolvimento do tipo sincrônico em grupos os oócitos maturam em lotes e os animais apresentam desova total de um lote durante um ciclo reprodutivo, geralmente anual, em estações definidas de acordo com as variáveis ambientais e genéticas como, por exemplo, a tabarana (*Salminus hilarii*) (Honji *et al.*, 2009) e outras espécies de peixes tropicais migradores (Vazzoler, 1996). O desenvolvimento oocitário assincrônico ocorre em peixes com desova parcelada, ou seja, os oócitos maturam em lotes distintos o que permite que os animais possuam os gametas em todos os estágios de desenvolvimento dentro das gônadas, que são eliminados em intervalos ao longo do ano, de acordo com a condição ambiental favorável, o que ocorre, por exemplo, com o pirarucu (*Arapaima gigas*) (Monteiro *et al.*, 2010).

Quando se fala em estratégia reprodutiva os peixes são muito complexos, pois possuem vários fatores fisiológicos e comportamentais diferentes entre as espécies que geram essa complexidade, como por exemplo diferentes formatos anatômicos das gônadas, diferentes formas de liberação dos gametas na fertilização externa (como por exemplo, a desova total ou a desova parcelada anteriormente citadas), desenvolvimento de diferentes órgãos especializados para a fertilização interna (ex: gonopódio), formas diferentes de cuidado ou não com a prole (guardadores e não guardadores de ovos e larvas), diferentes formas de construções de ninhos ou a migração que pode ser na forma de “piracema” ou aquelas com longas migrações entre os mares e rios que são acompanhadas por grandes alterações osmóticas e metabólicas. No Brasil, grande parte dos teleósteos de valor comercial são representados pelas espécies migradoras (reofílicas), ou seja, são peixes que durante um determinado período (que pode variar entre as espécies), realizam migrações ao longo do rio e vencem obstáculos naturais

como corredeiras e cachoeiras para se reproduzir (Lucas e Baras 2001; Baldisserotto e Gomes 2005).

1.5 Ações antrópicas

As informações até aqui apresentadas evidenciam que os fatores ambientais são questões importantes, pois modulam a reprodução das espécies de peixes. Desta forma quando um ambiente torna-se alterado ou inapropriado para o desenvolvimento completo do ciclo de vida de uma espécie, esta deve ajustar-se às novas condições (Braga, 2001). Uma destas alterações são as ações antrópicas em ambientes aquáticos, com a construção dos reservatórios se tornando mais frequente, devido à necessidade de produção de energia ou o fornecimento de água para consumo humano. Suas consequências afetam fortemente as populações de peixes, principalmente em peixes migratórios (Araújo, 1998; Silva *et al.*, 2010). Nestes casos a migração é necessária para o desenvolvimento dos ovários e testículos, maturação dos gametas e desova, então as barragens se tornam um importante obstáculo para a reprodução (Agostinho *et al.*, 2007a).

Com a finalidade de diminuir o impacto ambiental causado, uma opção adotada pelas empresas responsáveis pelas barragens e regulamentado pela legislação federal, é a implantação de pisciculturas de conservação para o repovoamento das espécies nativas do rio em questão (Souza *et al.*, 2006). Para esta atividade é necessária a captura de reprodutores no ambiente natural para conduzir a reprodução em cativeiro. Como são espécies migratórias a manutenção destes animais em cativeiro impede que o ciclo reprodutivo se complete e estas espécies não se reproduzem, havendo então a necessidade da indução hormonal para a efetivação da reprodução (Agostinho *et al.*, 2007b). Esse processo de indução hormonal corresponde à suplementação de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, com o uso de hormônios sintéticos ou extratos hipofisários de peixes doadores (Caneppele *et al.*, 2009; Honji *et al.*, 2011). Essa técnica é muito utilizada em espécies de peixes tropicais, inclusive na região de estudo da presente proposta, que é a região da Bacia do Alto Tietê. Nesta bacia, que possui um potencial hídrico importante no abastecimento de cidades da região metropolitana de São Paulo, muitas barragens foram construídas desde a década de 60 e uma estação de

piscicultura foi estabelecida com a proposta de mitigar os impactos do barramento, produzindo formas jovens para o repovoamento (Toledo-Filho *et al.*, 1992).

A produção de jovens para o repovoamento requer o conhecimento biológico da espécie em questão e o entendimento dos aspectos reprodutivos específicos. Na Bacia do Alto Tietê trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa foram conduzidos para o domínio da reprodução induzida da tabarana, *Salminus hilarii* (Honji *et al.*, 2011), mas outras espécies de importância na bacia ainda demandam estudos mais específicos, como é o caso dos lambaris. O grupo dos lambaris compreende espécies importantes na Bacia do Alto Tietê, como o *Astyanax fasciatus*, que constitui uma espécie alvo para o programa de repovoamento do DAEE (Departamento de Águas e Energia Elétrica). Esta espécie vem sendo produzida rotineiramente na Piscicultura da Barragem de Ponte Nova e utilizada no repovoamento do rio Tietê e seus tributários nesta região.

1.6 *Astyanax fasciatus*

O gênero *Astyanax* é rico em número de espécies e tem uma ampla distribuição geográfica, por isso tem alguns táxon incertos quanto a definição de espécie (Garutti e Britski, 1997). As populações do gênero *Astyanax* muitas vezes têm pouca diferenciação morfológica, ecológica e comportamental, o que sugere ser um grupo sob especiação (Gurgel, 2004).

Astyanax fasciatus é uma das espécies deste gênero e se diferencia por apresentar coloração avermelhada em sua nadadeira caudal e é conhecido popularmente como lambari do rabo vermelho. Apesar do seu pequeno porte é importante na cadeia alimentar do ecossistema, além de ser considerado também como um bom bioindicador de poluição de rios por se tratar de uma espécie com uma alta tolerância a variações bióticas como, condutividade, total de sólidos dissolvidos, temperatura e pH (Schulz e Martins, 2000).

Quanto à alimentação *A. fasciatus* é considerado onívoro com maior propensão a insetívoro (Agostinho *et al.*, 2003). Estes animais podem apresentar táticas reprodutivas diferenciadas dependendo das características do ambiente, sendo que as populações podem apresentar desova total ou parcelada (Silva *et al.*, 2010). São animais que migram para se reproduzir,

porém não fazem longas migrações, sendo estas migrações apenas em curtos trechos, como braços dos rios, mas a reprodução pode ser comprometida caso estes animais sejam impedidos de migrar.

Na Piscicultura da Barragem de Ponte Nova, localizada na Bacia do Alto Tietê existem plantéis desta espécie, mas alguns animais apresentaram dificuldades no processo de indução à reprodução. Observações mais detalhadas evidenciaram algumas diferenças morfológicas dentre os diferentes animais e análises preliminares confirmaram que o plantel da piscicultura está formado por diferentes grupos de lambaris, um com número de cromossomos $2n=46$ (G1) e outro $2n=48$ (G2), mas que são comumente chamadas até o momento como *Astysnax fasciatus* ou “lambari do rabo vermelho” (Pansonato-Alves *et al.*, 2013). Após essa diferenciação ficou claro para os técnicos da piscicultura que os indivíduos com número de cromossomos maior apresentam sucesso nos procedimentos de reprodução induzida, no entanto para aqueles animais com número menor de cromossomos a reprodução induzida não está gerando resultados positivos, com a não desova ou baixa na qualidade da mesma.

A presença de variantes de cariótipos em *A. fasciatus* já é conhecida na literatura e considerando-se o comportamento migratório da espécie, alguns autores sugerem que dificuldades na migração podem segregar animais com cariótipos diferentes, sendo alguns mais residentes que outros (Pazza *et al.*, 2007). De acordo com Guerra (1988), variações no cariótipo podem ocorrer entre diferentes populações da mesma espécie e estas diferenças podem envolver não apenas o número de cromossomos, como também a estrutura cromossômica. No entanto, ainda não havia sido demonstrado que esta variação cariotípica poderia estar associada com diferenças na fisiologia reprodutiva desta espécie, o que vem sendo relatado na Piscicultura da Barragem de Ponte Nova (Hilsdorf, comunicação pessoal).

Estas informações deixam claro que o manejo reprodutivo destes animais deve ser restabelecido após o conhecimento da sua biologia e da sua fisiologia reprodutiva. Com base nestas informações, nossa hipótese é que o insucesso no manejo reprodutivo dos animais do G1 desta espécie, quando em cativeiro, deve-se a possíveis diferenças na fisiologia reprodutiva entre os dois grupos.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

O objetivo do presente estudo foi estudar a fisiologia reprodutiva de *Astyanax fasciatus* com diferentes números de cromossomos, em ambiente natural (AN) e em cativeiro (Cat) e as possíveis alterações que possam explicar diferentes resultados de resposta à reprodução induzida em cativeiro.

2.2. Específicos

Para atingir o objetivo geral acima proposto, foram estabelecidos alguns objetivos específicos, comparando-se as informações obtidas nos animais de *A. fasciatus* com diferentes cariótipos, considerando que o grupo com número cariotípico $2n=48$ tem o processo reprodutivo em cativeiro dominado:

- Identificar o período reprodutivo dos grupos e compará-los, utilizando informações morfológicas das gônadas e o perfil de esteroides gonadais;
- Determinar a estratégia reprodutiva (assincrônico ou sincrônico em grupos) dos animais de ambos os grupos, por meio da determinação da fecundidade e distribuição de diâmetros oocitários ao longo do ano;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

A coleta se deu entre os anos de 2011 e 2013, em dois ambientes distintos, sendo seis fêmeas do G1 (2n=46) (Fig.2) em cada estação do ano, coletadas em rios da Bacia do Alto Tietê e Cabeceiras (23°34'36.5"S; 45°54'23.9"W) (AN) e seis no cativeiro (Cat) também em cada estação do ano na Piscicultura da Barragem de Ponte Nova – SP (23°35'33.8"S; 45°58'09.1"W) (Fig.1). Além disto, foram coletadas seis fêmeas do G2 (2n=48) (Fig.3), também em ambiente natural (AN) e seis em cativeiro (Cat) (Fig.1) para comparação entre os diferentes ambientes, na mesma periodicidade, ou seja, foram formados quatro grupos experimentais sendo: G1 AN (grupo 1 em ambiente natural), G1 Cat (grupo 1 em cativeiro), G2 AN (grupo 2 em ambiente natural) e G2 Cat (grupo 2 em cativeiro). As coletas ao longo das diferentes estações do ano tiveram como objetivo a representação de animais em todos os estágios do ciclo reprodutivo (repouso, maturação, maturação avançada/maduro e esgotado/regressão) com acompanhamento anual da fecundidade, diâmetro oocitário, dados histológicos e concentração plasmática de estradiol (E2).

Os animais foram coletados durante o período da manhã com redes de espera, tarrafa ou vara e isca viva no AN, e com rede de arrasto nos viveiros da piscicultura, que já apresentava um plantel de indivíduos dos dois grupos. Após este procedimento, os animais foram transportados para o laboratório e anestesiados (1 g de benzocaína diluída previamente em 10 ml de etanol) para coleta de sangue por punção da vasculatura caudal com seringas e agulhas descartáveis e heparinizadas (Hepamax® S 5000i) (Fig.4). As amostras de sangue foram centrifugadas a 655.2 g por 5 minutos e o plasma foi congelado em freezer -80°C, no Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos, localizado no Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências, até o processamento. Em seguida os dados morfométricos (cm) e ponderais (g) foram registrados (Fig.5), com o uso de régua e balança Ohaus, modelo Scout pro 400, respectivamente.

Após este procedimento as fêmeas foram eutanasiadas por secção da medula espinhal na altura do opérculo (Protocolo Comitê de Ética 172/2012).

Para retirada dos ovários foi feita uma incisão ventral no sentido caldo-cranial a partir do poro urogenital, os ovários retirados foram pesados para o cálculo do Índice Gonadosomático (IGS) (Fig.6), que expressa a porcentagem que as gônadas representam em relação ao peso total dos animais ($IGS = \text{massa das gônadas} \times 100 / \text{massa corpórea}$) uma porção do ovário direito foi seccionada e armazenada para determinação da fecundidade e diâmetro oocitário e outra para a caracterização histológica.

Figura 1: Piscicultura da Barragem de Ponte Nova (a), Bacia do Alto Tiete e tributários (b).

Figura 2 : *Astyanax fasciatus*. Biometria do grupo experimental 1, coletado na Bacia do Alto Tietê.

Figura 3 : *Astyanax fasciatus*. Biometria do grupo experimental 2 coletado na Bacia do Alto Tietê.

Figura 4: *Astyanax fasciatus*. Punção de sangue do grupo experimental 1.

Figura 5: *Astyanax fasciatus* - massa corpórea (g) dos animais G1 (a) e G2 (b).

Figura 6: massa gonadal (g) dos Ovários: G1Cat (a), G1 AN (b), G2 Cat (c) e G2 AN (d).

3.2 Determinação da fecundidade e diâmetro dos oócitos

A fecundidade é definida como o número de oócitos liberados a cada desova (Vazzoler, 1996), sendo assim avaliada em fêmeas em estágio de maturação avançado. Para a análise da fecundidade e do diâmetro oocitário, as amostras dos ovários, devidamente pesados, foram fixadas em líquido de Gilson (880ml água destilada, 100ml de etanol 60⁰GL, 18ml de ácido acético glacial, 15ml de ácido nítrico, 20g de cloreto de mercúrio sublimado). Segundo Simpson (1951) o tecido deveria permanecer nesta solução por cerca de 30 dias para a dissolução de tecido envoltório, porém para que as amostras de ovário de *A. fasciatus* fossem totalmente dissolvidas, houve a necessidade de mais tempo no líquido de Gilson, cerca de 60 dias.

Após a total dissolução dos tecidos envoltórios os oócitos foram transferidos para etanol 70⁰ GL. Para o procedimento de mensuração e contagem dos oócitos estes foram ressuspensos em 1L de etanol 70⁰GL e retirado 2ml do homogenizado de oócitos com uma pipeta Stempel (Fig.7a). Esta subamostra foi transferida para uma placa de acrílico milimetrada (Fig.7b) para medição e contagem dos oócitos (Figs.7c e 7d) com o uso de microscópio e do programa *Leica DM1000 (light microscope, Leica DFC295 photographic camera and image capture Leica Application Suite Professional, LASV3.6)*. Os diâmetros foram divididos em onze classes: 0 a 100µm, 101 a 200µm e assim sucessivamente até 1000 a 1100µm para se encontrar a porcentagem de oócitos em cada classe de diâmetro. Para *A. fasciatus* foram considerados como vitelogênicos os oócitos com diâmetros acima de 601 µm, pois foi a partir deste diâmetro que eles se apresentaram densos e com coloração escura caracterizando aspecto de vitelogênico. Todo este processo foi feito em triplicata. Após as medidas e contagens dos oócitos foi feita uma média da triplicata e foram calculadas a fecundidade absoluta (FA), e fecundidade relativa à massa corpórea (FR) a partir das seguintes fórmulas:

Número total de oócitos por fêmea= (Número de oócitos contados no gilson x peso total da gônada) / peso da porção seccionada e colocada na sol. de gilson

FA = (% oócitos vitelogênicos x número total de oócitos por fêmea) / 100

FR = FA/massa do animal

Figura 7: Pipeta Stempel utilizada para retirada de 2ml do homogeneizado com oócitos (a). Placa de acrílico para contagem dos oócitos (b). Imagens dos oócitos (c), medida dos oócitos em µm (d).

3.3 Caracterização histológica das gônadas

Para confirmação do estágio de maturação gonadal, as amostras retiradas do terço médio dos ovários (a massa usada para histologia foi descontada da massa a ser utilizada na fecundidade) foram fixadas em bouin acético (750 ml de ácido pícrico saturado, 200 ml de formol e 50 ml de ácido acético glacial, sendo que para solução de ácido pícrico saturado: 1,5g de ácido pícrico em 100 ml de água destilada) por 24 horas, depois desse período o bouin acético foi descartado e as amostras foram lavadas em água corrente e estocadas em etanol 70⁰GL. Para o procedimento histológico as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol (*dimethybenzene*) e incluídas em paraplast®. Em seguida foram cortadas em micrótomo (Leica –RM/2255, equipado com navalhas descartáveis) em cortes de 5µm de espessura, que foram montados em lâminas e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina (Behmer *et al.*, 1976). Após a coloração, as lâminas foram novamente desidratadas e diafanizadas para fechamento com lamínula e goma Damar. Os cortes foram analisados com um sistema de computador com captura de imagem –*Leica DM1000 (light microscope, Leica DFC295 photographic câmera and image capture Leica Application Suite Professional, LASV3.6)*. O protocolo completo segue no anexo 1. O desenvolvimento gonadal foi classificado em inicial,

inicial/intermediário, intermediário/avançado e avançado, a partir da frequência dos estágios de desenvolvimento das células germinativas presentes em cada animal. Esta análise foi registrada utilizando-se cruzes onde: + presente; ++ frequente; +++ predominante; --- ausente. De acordo com o estágio de desenvolvimento dos gametas femininos, estes foram classificadas, segundo Honji *et al.*, (2009), em: perinucleolar, alvéolo-cortical, vitelogênico; sendo verificada ainda a existência de folículos atrésicos e pós ovulatórios.

3.4 Concentração de 17 β -estradiol (E2) plasmático

O estrógeno 17 β -estradiol (E2) foi quantificado no plasma pelo método de elisaimunoensaio (ELISA), com uso de kits comerciais (*IBL International/Hamburg, Germany*). As análises foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (protocolo completo segue no anexo 2). As amostras foram testadas com relação à diluição, pois os kits são fabricados para uso em mamíferos, então, as concentrações ficaram acima da curva padrão sendo necessária a diluição. As diluições utilizadas para as amostras de plasma foram de 1:2 ou 1:4 dependendo do estágio de maturação gonadal o diluidor foi água ultra pura. Todas as amostras foram dosadas em duplicata. As leituras de absorbância foram realizadas em um leitor de microplacas (*Spectra Max 250, Molecular Devices*).

3.5 Análises estatísticas

As comparações das concentrações de E2, FA, FR, massa corpórea, diâmetro oocitário e IGS foram realizadas entre os animais dos dois ambientes (AN e Cat), dentro de cada grupo ao longo do ano. Além disso, foi feita uma análise qualitativa e descritiva dos dados nos dois ambientes comparando animais com diferentes cromossomos ao longo do ano. Foram aplicados testes de análise de variância (*Two-way ANOVA*) para cada grupo experimental (G1 e G2), tendo como fatores "Ambiente" e "Estação do Ano", seguidos do teste Holm-Sidak. A correlação da fecundidade foi calculada por regressão linear tendo a massa corpórea como variável (Honji *et al.*, 2009). As concentrações de E2 foram transformadas em log₁₀ para normalizar os dados e apresentadas na concentração original nos gráficos. Em todas as análises as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Dados Biométricos:

Foi feita uma análise biométrica de todas as fêmeas antes da eutanásia, registrando-se a massa corpórea e a massa das gônadas, dados utilizados para o cálculo do IGS, nos dois grupos. A partir dos dados apresentados na Fig. 8, fica claro que as fêmeas desta espécie mantidas em cativeiro apresentaram massa corpórea superior àquela dos animais de ambiente natural. Além disso, as fêmeas do G2 foram significativamente menores ($P < 0,001$) que aquelas do G1, apresentando quase metade da massa corpórea. Não houve diferença significativa entre as estações, dentro dos grupos.

Figura 8 : Massa corpórea (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* dos grupos G1 (2n=46) e G2 (2n=48) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano (n=24). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

4.2 Índice gonadossomático – IGS

O IGS por sua vez apresentou um padrão temporal diferente entre os ambientes. As fêmeas do G1, quando em AN, mantiveram o IGS estável quase o ano inteiro com exceção do outono, quando este índice foi menor ($P = 0,009$).

Em contrapartida, quando no Cat as fêmeas deste mesmo grupo alteraram o padrão de IGS, que apresentaram valores mais altos no período de primavera e verão, e diminuíram significativamente no outono e inverno ($P=0,009$) (Fig. 9). Na comparação entre os dois ambientes, diferenças significativas foram encontradas durante a primavera, o verão e o outono, com os maiores valores de IGS para os animais de cativeiro ($P=0,013$; $0,001$; $0,001$ respectivamente).

As fêmeas do G2, quando em AN, apresentaram aumento do IGS na primavera com pico no verão, e, em seguida apresentaram uma diminuição significativa dos valores no outono e inverno ($P=0,002$; $0,008$ respectivamente). Por outro lado, quando mantidas no Cat, estas fêmeas mantiveram o IGS constante durante todo o ano. Em uma comparação entre os dois ambientes não houve diferenças estatísticas significativas no IGS das fêmeas do G2 (Fig. 10).

Figura 9: Índice Gonadosomático (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G1 ($2n=46$) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano ($n=6$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P<0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P<0,05$).

Figura 10: Índice Gonadosomático (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G2 (2n=48) coletadas no ambiente natural (AN) e cativo (Cat) ao longo de um ano (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

4.3 Fecundidade

4.3.1 Fecundidade absoluta

Em seu ambiente natural as fêmeas do G1 apresentaram um pico de fecundidade absoluta na primavera com cerca de 7 mil oócitos vitelogênicos, com queda significativa para 359 oócitos vitelogênicos ($P=0,010$) no verão, e queda maior ainda comparando-se com o outono ($P=0,009$), estação na qual as fêmeas não apresentaram oócitos vitelogênicos nos ovários, retomando os valores no inverno ($P=0,013$). Já nas fêmeas mantidas no Cat a fecundidade absoluta foi mais alta que no AN sendo que o pico se deu na primavera e verão sem diferença significativa entre eles, com números absolutos por volta de 24 mil oócitos vitelogênicos, e queda significativa no outono e inverno ($P=0,013$) para aproximadamente 10 mil. Quando foram comparadas as fêmeas do G1 nos dois ambientes houve diferenças significativas em todas as estações, com maiores valores para as fêmeas em Cat ($P < 0,001$, $< 0,001$, $< 0,001$ e $0,017$ (Fig.11)).

Nas fêmeas do G2 em AN os índices não apresentaram diferenças estatísticas significantes durante as estações, mesmo variando de cerca de 20 e 27 mil oócitos vitelogênicos na primavera e inverno, respectivamente, a cerca de 2 mil no verão e outono provavelmente pela heterogeneidade entre os

animais dentro do mesmo grupo e consequentemente elevados valores do desvio padrão. Já quando mantidas no Cat as fêmeas do G2 apresentaram a fecundidade absoluta inalterada desde a primavera até o outono, com aumento significativo no inverno em relação ao outono ($P=0,009$). Os valores absolutos se mantiveram em 57, 41 e 34 mil oócitos vitelogênicos na primavera, verão e outono respectivamente, com aumento para cerca de 70 mil no inverno. Quando as fêmeas do G2 foram comparadas nos dois ambientes houve diferenças significativas em todas as estações, com maiores valores para as fêmeas em Cat ($P= 0,008, 0,002, 0,012$ e $0,001$) (Fig.12).

Figura 11 : Fecundidade absoluta (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G1 ($2n=46$) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano ($n=6$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P<0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P<0,05$).

Figura 12: Fecundidade absoluta (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G2 (2n=48) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

4.3.2 Fecundidade Relativa

Quando analisados com relação à massa corpórea, ou seja, a fecundidade relativa (FR) as fêmeas do G1, quando no AN, apresentaram a FR aumentada na primavera com aproximadamente 200 oócitos/g massa corpórea, com queda significativa entre a primavera e o verão ($P < 0,001$) quando a fecundidade chegou a aproximadamente 20 oócitos/g massa corpórea, chegando à zero no outono e voltando a aumentar no inverno com cerca de 200 oócitos/g massa corpórea ($P = 0,001$). Porém quando mantidas em cativeiro as fêmeas deste mesmo grupo apresentaram uma alteração da porcentagem de oócitos vitelogênicos, com a FR se mantendo alta e inalterada durante a primavera e o verão (~ 400 oócitos/g massa corpórea) com queda significativa entre o verão e o outono ($P < 0,001$) que se manteve baixa no inverno (~200 oócitos/g massa corpórea) ($P < 0,001$). Na comparação entre os dois ambientes, as fêmeas do grupo Cat apresentaram a FR significativamente maior na primavera, no verão e no outono ($P = 0,001$; $< 0,001$; $< 0,001$ respectivamente) (Fig. 13).

Animais do G2 no AN apresentaram a FR com padrões parecidos, porém com números absolutos diferentes quando comparados às fêmeas do G1. No

AN há um aumento da FR já na primavera também, porém este aumento foi referente à aproximadamente 2000 oócitos/g massa corpórea, com uma diminuição significativa no verão e outono ($P=0,001$), quando chegaram a cerca de 200 oócitos/g massa corpórea e um aumento no inverno retomando os valores da primavera de aproximadamente 2000 oócitos/g massa corpórea ($P=0,001$). As fêmeas deste mesmo grupo, quando em cativeiro, não mantiveram os mesmo padrões do G1, com a FR em torno de 2200 oócitos/g massa corpórea na primavera que se manteve sem alterações significativas no verão e outono, porem com queda dos números absolutos para cerca de 1200 oócitos/g nessas estações e com aumento significativo no inverno para 2500 oócitos/g massa corpórea ($P=0,003$). Quando as fêmeas do G2 foram comparadas entre os dois ambientes houve diferenças significativas no verão e outono, com maiores valores de FR para as fêmeas em Cat ($P=0,001$; 0,007, respectivamente) (Fig.14).

Figura13 : Fecundidade relativa (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G1 ($2n=46$) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano ($n=6$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P<0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P<0,05$).

Figura 14 : Fecundidade Relativa (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G2 (2n=48) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

4.4 Frequência dos diâmetros oocitários

4.4.1 Padrão da frequência dos diâmetros oocitários ao longo do ano

A frequência dos diâmetros dos oócitos apresentou padrões com duas modas ao longo do ano. A primeira, que corresponde aos oócitos residuais, ou seja, o estoque de oócitos a ser recrutado no próximo ciclo reprodutivo com cerca de 60 a 70% dos oócitos com diâmetros mais baixos (abaixo de 600 μ m) no grupo G1 e 40 a 50% no grupo G2; e a segunda moda com oócitos de diâmetros maiores, que corresponde aos oócitos vitelogênicos (acima de 601 μ m) com cerca de 10% para ambos os grupos (Fig.15).

Figura 15 : Frequência de diâmetros oocitários (Médias) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* dos grupos G1 (2n=46) e G2 (2n=48) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano (n=6). As cores diferentes representam as estações do ano.

4.4.2 Oócitos vitelogênicos

Quando analisada estatisticamente a moda correspondente aos maiores diâmetros (oócitos vitelogênicos) do gráfico da Fig.16, animais do grupo experimental G1 em AN, tem sua maior porcentagem de oócitos vitelogênicos na primavera e verão com cerca de 10% e inverno com cerca de 7%, com diminuição significativa no outono, acompanhando a fecundidade relativa para esta estação ($P=0,001$). Nas fêmeas mantidas no Cat, nesse mesmo grupo, os índices se mantêm parecidos à FR com maiores valores na primavera e verão com cerca de 15 a 20% e diminuição no outono e inverno para cerca de 10% ($P=0,009$). Quando comparados os dois grupos na mesma estação houve maior porcentagem de oócitos vitelogênicos nas fêmeas de cativeiro na primavera, verão e outono ($P=0,007$, $<0,001$ e $0,002$ respectivamente) (Fig.16)

Por outro lado, nos animais do G2, a porcentagem de oócitos vitelogênicos não se alterou ao longo das estações (Fig.17)

Figura 16: Porcentagem dos oócitos vitelogênicos (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G1 (2n=48) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

Figura 17 : Porcentagem dos oócitos vitelogênicos (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G2 (2n=48) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

4.4.3 Oócitos residuais

Quando nos referimos à moda maior do gráfico de frequência de diâmetros, os dados de oócitos residuais (menor diâmetro oocitário), houve um comportamento oposto ao observado nos oócitos vitelogênicos, o que já seria esperado por se tratar de porcentagem. Portanto, de igual forma animais do grupo experimental G1 em AN, tiveram sua menor porcentagem de oócitos residuais na primavera e verão com cerca de 80% e inverno com 83%, com aumento significativo no outono para 100% ($P= 0,001$). Nas fêmeas mantidas no Cat, nesse mesmo grupo, os índices se mantiveram com menores valores na primavera e verão com cerca de 80%, aumentando no outono e inverno para cerca de 90% ($P=0,009$). Quando comparados os dois grupos na mesma estação houve maior porcentagem de oócitos vitelogênicos nas fêmeas de cativeiro na primavera, verão e outono ($P= 0,007$, $<0,001$ e $0,002$ respectivamente) (Fig.18). Para fêmeas do G2 da mesma maneira a porcentagem de oócitos residuais não se alterou ao longo das estações (Fig.19).

Figura 18 : Porcentagem dos oócitos residuais (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G1 ($2n=46$) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano ($n=6$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P<0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P<0,05$).

Figura 19 : Porcentagem dos oócitos residuais (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G2 (2n=48) coletadas no ambiente natural (AN) e cativo (Cat) ao longo de um ano (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P < 0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P < 0,05$).

4.5 Concentração de E2 plasmático

A concentração de E2 plasmático nas fêmeas do G1 em AN se manteve praticamente constante o ano todo, com exceção do outono quando apresentou uma queda significativa em relação às outras estações do ano ($P=0,033$ em relação à primavera; $P=0,001$ em relação ao verão; $P=0,015$ em relação ao inverno) (Fig. 20). Por outro lado, as fêmeas deste mesmo grupo quando mantidas em cativeiro apresentaram seu padrão hormonal totalmente diferenciado, com uma queda entre a primavera e o verão ($P=0,003$), se mantendo estável até o outono e um aumento acentuado no inverno com diferenças significativas deste para as outras estações ($P=0,003$ quando comparado com primavera, $<0,001$ quando comparado com verão e outono). Na comparação entre os dois ambientes, as fêmeas do Cat apresentaram a concentração de E2 mais elevada que as fêmeas do AN no inverno e na primavera ($P=0,001$; $P<0,001$, respectivamente) (Fig. 20).

Nas fêmeas do G2 em AN, a concentração plasmática de E2 se manteve alta e estável praticamente o ano todo com apenas uma queda significativa entre a primavera e o verão ($P=0,001$). Quando no Cat houve alteração em

relação ao padrão apresentado no AN, sendo a concentração de E2 mais elevada no outono em relação à primavera ($P=0,009$). Na comparação entre os dois ambientes, as fêmeas do G2 em Cat apresentaram a concentração de E2 maior que no AN no verão, outono e inverno ($P<0,001$; $P<0,001$ e $P<0,002$, respectivamente) (Fig. 21).

Figura 20: Concentração plasmática de estradiol (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G1 ($2n=46$) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano ($n=6$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P<0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P<0,05$).

Figura 21: Concentração plasmática de estradiol (Média $\pm$ DP) de fêmeas de *Astyanax fasciatus* do grupo G2 ($2n=48$) coletadas no ambiente natural (AN) e cativeiro (Cat) ao longo de um ano ($n=6$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais dentro de um mesmo ambiente ($P<0,05$). Barras com símbolos significam diferenças estatísticas considerando-se o mesmo grupo em ambientes diferentes ($P<0,05$).

4.6 Análises histológicas

A partir de uma observação descritiva dos ovários foi avaliada a presença de diferentes fases de desenvolvimento do ciclo folicular e oocitário com a intenção de identificar os tipos celulares predominantes para caracterizar o estágio de maturação gonadal (Tabelas 1 e 2). Essas células passaram por diferentes fases de crescimento e foram classificadas de acordo com Honji *et al.* (2009) em:

- **Perinucleolar (PN):** oócitos que se separaram do ninho de oogônias com um pequeno aumento de volume comparado as oogônias. O citoplasma é basófilo e bem definido, com numerosos nucléolos na periferia do núcleo. Esse tipo celular está presente em todos os estágios de maturação gonadal, pois são considerados como células de estoque para futuras reproduções (Fig. 22e).

- **Cortical alveolar (CA):** oócitos com maior tamanho em relação aos PN com vacuolização na periferia do citoplasma, esta vacuolização caracteriza-se por deposições lipídicas. Este processo é geralmente chamado vitelogênese endógena e é caracterizado por vitelogênese lipídica, o que representa a transição entre a presença de vesículas lipídicas e a deposição de grânulos de proteína (vitelogênese exógena). Estas vesículas de lípidios aparecem no citoplasma das células como esferas vazias, devido a utilização de etanol no processamento histológico, não havendo assim a coloração com hematoxilina-eosina. O citoplasma se torna acidófilo, e as células foliculares podem ser mais facilmente observadas. Esta é a fase em que a zona radiata torna-se evidente. Esse tipo celular quase não foi identificado nos grupos deste estudo, com exceção do G1 Cat no inverno, do G2 AN no verão e no inverno e no G2 Cat no verão.(Fig. 22 g).

- **Vitelogênico (V):** Os oócitos aumentam de tamanho devido aos grânulos de vitelo altamente acidófilos (proteína) que se acumulam no interior das vesículas basófilas do citoplasma. Este processo é muitas vezes chamado de vitelogênese exógena e a incorporação dos grânulos de vitelo ocorre através micropinocitose. A basofilia desaparece quase completamente, o citoplasma se torna mais denso, ainda mais acidófilo, e a distribuição de grânulos de

proteínas (esferas) parecem ser homogêneos. As células foliculares podem ser facilmente vistas, mesmo neste nível de análise. No início desta fase, o núcleo é central ou ligeiramente excêntrico, com pequenos nucléolos. Este tipo celular foi observado em ambos grupos em praticamente todas estações, com exceção do G1 AN no outono. A presença deste estágio de desenvolvimento oocitário foi fundamental para classificar o estágio gonadal como Avançado (Fig.22a).

- **Oócito atrésico (A):** Este estágio consiste em oócitos que não foram ovulados e então entram no processo de reabsorção pelo organismo. Estes oócitos são caracterizados pela desorganização estrutural degeneração celular. Todas as estruturas que compõem um folículo ovariano (oócito e camadas foliculares) serão reabsorvidas. Os grânulos acidófilos (esferas de vitelo), quando presentes, perdem a sua individualidade, formando uma massa amorfa de substâncias acidófilas. O aspecto geral de um oócito atrésico é que ele não mantém uma forma definida. Também é possível observar a presença de vacúolos e pequenos flocos amarelados, dependendo do estágio de degeneração. Oócitos atrésicos pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento gonadal (Fig.23 a).

- **Folículo pós ovulatório (POF):** Os folículos pós ovulatórios são constituídos de células foliculares que permanecem nos ovários após a ovulação. Estas células tendem a entrar em colapso devido à pressão mecânica e aparecem como estruturas distorcidas sem células no seu lúmen. Os folículos pós-ovulatórios estão presentes durante o período de desova e são reabsorvidos pelo organismo. Essa estrutura só foi observada em animais de ambiente natural. Evidenciando que os animais de cativeiro não ovulam (Fig.23c).

A partir da observação desses tipos celulares foi definido em qual estágio de maturação as fêmeas se encontravam ao longo das estações. Os estágios de maturação foram divididos em:

- **Inicial:** Observado em fêmeas com maior frequência ou exclusivamente a presença de oócitos perinucleolares e folículos pós ovulatórios.

- **Inicial/Intermediário:** Ainda há predominância de oócitos perinucleolares, porém há também uma frequência relativamente alta de oócitos vitelogênicos, podendo apresentar ainda oócitos atrésicos e folículos pós ovulatórios.
- **Intermediário/Avançado:** Predominam os oócitos perinucleolares e vitelogênicos em proporções semelhantes, podendo conter também oócitos corticais alveolares em menores proporções e atrésicos e folículos pós ovulatórios.
- **Avançado:** Há predominância de oócitos vitelogênicos, porém há também uma frequência relativamente grande de oócitos perinucleolares, podendo apresentar oócitos alveolares em menores proporções e atrésicos e folículos pós ovulatórios.

Ao analisar o G1 quando em ambiente natural estes parecem ter uma grande quantidade de oócitos perinucleolares em todos os períodos analisados, se mantendo entre intermediário/avançado na primavera (Fig. 22a) e no verão (Fig. 22c). Já no outono (Fig. 22e) os oócitos vitelogênicos não estão presentes corroborado com os dados de fecundidade, e os animais se mantêm em estágio inicial, sendo também observados folículos pós ovulatórios, voltando a apresentar oócitos vitelogênicos no inverno (Fig.22g), quando as fêmeas foram classificadas em estágio inicial/intermediário. Quando em cativeiro, estas fêmeas parecem ficar em estágio de maturação avançado o ano todo, com predominância de oócitos vitelogênicos em todas as estações (Tabela 1) .

Tabela 1. Classificação do estágio de maturação ovariano baseado nas fases do desenvolvimento dos oócitos de fêmeas de *A. fasciatus* do grupo G1 (2n=46).

Grupos	Estação	Fases do desenvolvimento do oócito					Estagio de maturação
		PN	CA	V	A	POF	
G1 Cat	Primavera	+	–	+++	–	–	Avançado
	Verão	+	–	+++	–	–	Avançado
	Outono	++	–	+++	–	–	Avançado
	Inverno	++	–	+++	–	–	Avançado
G1 AN	Primavera	++	–	++	–	–	Intermediário/Avançado
	Verão	++	–	++	+	–	Intermediário/Avançado
	Outono	+++	–	–	–	+	Inicial
	Inverno	+++	+	++	+	–	Inicial/Intermediário

PN: perinucleolar; CA: cortical alveolar; V: vitelogênico; A: atrésico; POF: Folículo pós ovulatório; + presente; ++ frequente; +++ predominante; – ausente.

No G2 tanto as fêmeas de ambiente natural quanto as de cativeiro parecem ficar em estágio avançado ao longo do ano, com uma grande quantidade de oócitos vitelogênicos. Houve uma ocorrência de folículos pós ovulatórios em todas as estações quando em fêmeas de ambiente natural (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação do estágio de maturação ovariano baseado nas fases do desenvolvimento do oócito de fêmeas de *A. fasciatus* do grupo G2 (2n=48).

Grupos	Estação	Fases do desenvolvimento do oócito					Estagio de maturação
		PN	CA	V	A	POF	
G2 Cat	Primavera	++	+	+++	+	–	Avançado
	Verão	++	+	+++	+	–	Avançado
	Outono	++	+	+++	+	–	Avançado
	Inverno	++	+	+++	–	–	Avançado
G2 AN	Primavera	+	–	+++	+	+	Avançado
	Verão	++	+	+++	+	+	Avançado
	Outono	++	–	+++	–	+	Avançado
	Inverno	++	–	+++	–	+	Avançado

PN: perinucleolar; CA: cortical alveolar; V: vitelogênico; A: atrésico; POF: Folículo pós ovulatório; + presente; ++ frequente; +++ predominante; – ausente.

Figura 22: Secção de ovário de *Astyanax fasciatus* com 46 cromossomos (G1) em ambiente natural na primavera (a), no verão (c), no outono (e) e no inverno (g). Corte de ovário de *Astyanax fasciatus* com 46 cromossomos (G1) em cativeiro na primavera (b), no verão (d), no outono (f) e no inverno (h). PN: perinucleolar; CA: cortical alveolar; V: vitelogênico; A: atrésico; POF: Folículo pós ovulatório.

Figura 23: Secção de ovário de *Astyanax fasciatus* com 48 cromossomos (G2) em ambiente natural na primavera (a), no verão (c), no outono (e) e no inverno (g). Corte de ovário de *Astyanax fasciatus* com 48 cromossomos (G2) em cativeiro na primavera (b), no verão (d), no outono (f) e no inverno (h). PN: perinucleolar; CA: cortical alveolar; V: vitelogênico; A: atrésico; POF: Folículo pós ovulatório.

5. DISCUSSÃO

5.1 Perfil reprodutivo de *Astyanax fasciatus* do G1 (n=46)

Claramente neste estudo as fêmeas do G1 iniciam seu ciclo reprodutivo em AN no inverno com o aumento da concentração de E2, resultando também no aumento do IGS e da FR que se mantém assim até a primavera e verão. Em seguida há uma brusca diminuição da FR no outono, provavelmente pela ocorrência da desova entre estas estações. Durante o ciclo reprodutivo, o aumento da massa dos ovários é caracterizado principalmente pela captação de vitelogenina, produzida no fígado, em resposta ao aumento da concentração de E2 no plasma (Lubzens *et al.*, 2010). Devido à estreita relação entre o processo de maturação gonadal, o aumento do volume e massa dos ovários, o valor de IGS é considerado como um parâmetro importante, e as análises temporais fornecem informações sobre o período reprodutivo das espécies (Vazzoler, 1996). Esses dados ficam ainda mais claros quando observam-se apenas oócitos perinucleolares e atrésicos e folículos pós ovulatórios no outono, corroborando com os dados de FR, IGS e E2. No início do inverno já há a frequência de oócitos vitelogênicos e predominância de oócitos residuais demonstrando claramente a desova destas fêmeas no outono e o restabelecimento dos parâmetros reprodutivos no inverno. Deste modo, os animais deste grupo, neste ambiente, aparentemente se mantêm com índices reprodutivos elevados (FR, IGS, E2 e morfologia) em quase todo o ano, com exceção do outono quando os mesmos índices diminuem pela provável desova.

É bem conhecida a dificuldade de desova de animais migradores quando mantidos em cativeiro (Miranda e Ribeiro, 1997; Resende *et al.*, 1995; Agostinho *et al.*, 2007a,b). No presente estudo, por exemplo, houve alteração dos parâmetros analisados em cativeiro quando comparados ao ambiente natural. As fêmeas do G1 quando mantidas em cativeiro apresentam um aumento na concentração de E2 também no inverno, porém com um valor absoluto mais elevado do que aquele encontrado nas fêmeas coletadas nas outras estações do ano e também do que nas fêmeas do AN, seguido do aumento de IGS e FR na primavera e verão. Deste modo, sugere-se que esses animais se ajustem de forma a continuar produzindo os oócitos vitelogênicos,

com mudanças, tanto temporais quanto quantitativas, nos parâmetros reprodutivos estudados. Honji *et al.* (2009) analisaram a fecundidade em fêmeas de *Salminus hilarii* no ambiente natural e mantidas em cativeiro e relataram que os animais de cativeiro apresentaram maior percentual de oócitos vitelogênicos do que os animais do rio. Neste mesmo estudo os autores verificaram menor fecundidade nos animais de cativeiro, porém estas fêmeas apresentaram oócitos maduros com maior diâmetro, demonstrando assim alterações ocorridas quando comparados os dois ambientes. Guzman *et al.* (2009) também relataram essa diferença entre ambientes ao analisar expressão de hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), hormônio folículo estimulantes (FSH) e hormônio luteinizante (LH) em fêmeas de *Solea senegalensis*, porém os valores foram significativamente maiores para animais de ambiente natural quando comparadas aqueles no cativeiro.

Os dados de FR e IGS do presente estudo demonstram que em cativeiro as fêmeas de *A. fasciatus* do grupo G1 não desovam, assim com já descrito anteriormente para outras espécies como *Salminus hilarii* (Honji *et al.*, 2009) e *Anguilla japonica* (Yamamoto *et al.*, 1974). Corroborando esses dados, as análises morfológicas demonstram que não estão presentes folículos pós ovulatórios ao longo do ano e os animais se mantêm com oócitos vitelogênicos o ano todo. Como a maioria dos dados reprodutivos (IGS, FR e oócitos vitelogênicos) se mantêm elevados ao longo do ano em relação aos animais de ambiente natural, exceto no inverno, e as análises de E2 só estão diferentes no inverno, com um brusco aumento da concentração deste estrógeno, sugere-se que a reprodução induzida deste animal em cativeiro tenha melhores resultados entre o inverno e a primavera, período imediatamente posterior ao pico de produção de estradiol com consequente aumento da fecundidade relativa.

5.2 Perfil reprodutivo de *Astyanax fasciatus* do G2 (n=48)

As fêmeas do G2 em ambiente natural iniciam seu ciclo reprodutivo antes do que as do G1, no outono, com o aumento gradativo do E2 que tem seu pico na primavera, acompanhado pelo aumento da FR já no inverno e primavera, sendo que esses parâmetros diminuem no verão com a provável desova. Alguns animais tropicais têm seu período de desova aliado ao período

de chuvas (primavera ao final do verão), com o aumento da pluviosidade e intensidade de precipitação, agregados a alta temperatura da água proporcionando um ambiente adequado para a sobrevivência da prole (Sato *et al.*, 2003; Andrade e Braga, 2005). Ou seja, as fêmeas do grupo G2 parecem ser adiantadas no tempo com relação ao G1 quando estes animais estão em seu ambiente natural. Porém quando analisadas quanto à morfologia dos ovários estas fêmeas mantêm predominância de oócitos vitelogênicos ficando aparentemente maduras o ano todo, com a presença de folículos pós ovulatórios também o ano todo, contradizendo os dados de fecundidade que demonstram que estes animais têm desova total. Estes resultados podem evidenciar uma tática deste grupo em apresentar variações do número total de oócitos vitelogênicos ao longo do ano, porém o ovário se mantém sempre com quantidades destes oócitos. Ou seja, o número total de oócitos diminui ao longo do ano, mas o estágio de desenvolvimento (oócitos vitelogênicos) se mantém.

Quando os animais estão no Cat há uma maior estabilidade de todos os parâmetros analisados quando comparados ao G1. Todos os índices testados se mantêm aparentemente estáveis e mais altos do que em ambiente natural ao longo do ano, a morfologia corrobora com estes dados sendo que os animais se mantêm caracteristicamente maduros o ano todo, porém sem evidência da presença de folículos pós ovulatórios demonstrando que estes também não desovam em cativeiro, assim como os animais do G1. Sugere-se que a permanência no cativeiro de alguma forma altere a sensibilidade às dicas ambientais de ciclo sazonal, e os níveis de E2 se mantêm mais elevados do que nas fêmeas capturadas no AN, praticamente o ano todo, classificando esse fator como um ajuste no seu *set point* para os parâmetros testados (Mrosovsky, 1990). Esta pode ser uma explicação para o maior sucesso desses animais na indução à reprodução quando em cativeiro.

Zohar e Mylonas (2001) sugerem existir três diferentes tipos de disfunções reprodutivas em fêmeas de teleósteos quando mantidas em cativeiro. No primeiro caso há falha completa da vitelogênese, comum nas enguias. O segundo e mais comum é a ausência de maturação final dos oócitos, a vitelogênese parece progredir normalmente, mas a quebra da vesícula germinativa e a ovulação não acontecem que é o caso da maioria das

espécies de teleósteos potamódromos. E o terceiro e último caso é aquele comum em trutas, quando ocorrem as fases de maturação final e ovulação, mas não ocorre a desova. Nestes últimos casos, os oócitos normalmente são reabsorvidos. Para ambos os grupos (G1 e G2) há ocorrência de estágios de maturação aparentemente com uma falta de quebra na vesícula germinativa sendo, portanto estes enquadrados na segunda disfunção descrita.

5.3 Comparação descritiva do perfil reprodutivo de *Astyanax fasciatus* com números de cromossomos diferentes (n=46 e n=48)

Os dados do presente estudo demonstram que os aspectos estudados da biologia reprodutiva das fêmeas de *Astyanax fasciatus* dos grupos G1 e G2, mesmo em seu ambiente natural, foram diferentes entre eles e também em relação aos dados disponíveis para esta espécie (Gurgel, 2004; Silva *et al.*, 2010). Por outro lado os dados de FR apresentaram um perfil temporal semelhante entre os dois grupos no AN, com seus maiores valores no inverno e na primavera, porém com valores absolutos diferentes. Dados apresentados em estudos anteriores divergem entre si com relação, por exemplo, ao tipo de desova. Segundo Gurgel (2004), estudando a reprodução desta espécie no Rio Grande do Norte, a desova é do tipo sincrônica em grupos com maior atividade nos bimestres de outubro/novembro e dezembro/janeiro assim como encontrado por Barbieri *et al.*, (1996). No entanto Silva *et al.*, (2010), realizando estudos no Paraná com a mesma espécie apresentaram dados de desova sincrônica na represa de Iraí e assincrônica nas represas de Piraquara e Passaúna. Portanto fica clara a dificuldade em determinar um ciclo reprodutivo padrão para esta espécie que aparentemente é oportunista e apresenta grande plasticidade reprodutiva relacionada ao ambiente em que habita. No presente estudo os animais apresentaram desova do tipo total em grupos.

Neste estudo ficou claro que os padrões reprodutivos estudados nos dois grupos têm níveis e números absolutos totalmente divergentes entre G1 e G2, como por exemplo, a fecundidade relativa que em G1 chega ao máximo de 400 e em G2 chegam a 2500 oócitos vitelogênicos relativizados pela massa. Os níveis do hormônio estradiol também ficaram diferentes entre os grupos com no máximo de 250 pg/ml em G1 e cerca de 4000 pg/ml em G2,

corroborando com os dados morfológicos, que existe uma clara diferença entre os dois grupos.

Quando estes grupos são mantidos em cativeiro também adotam padrões diferentes entre eles, sendo que os animais do G1 alteram seu perfil reprodutivo com um aparente atraso, pois quando em ambiente natural se reproduzem no verão/outono e em cativeiro tornam-se aptos à reprodução induzida no inverno/primavera. Já os animais do G2, quando em cativeiro, mantêm seus parâmetros reprodutivos elevados ao longo do ano.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Assim, conclui-se que fêmeas do G1 ($2n=46$) mantêm um ciclo reprodutivo sazonal em cativeiro, mas que difere daquele originalmente apresentado no ambiente natural. Desta forma, as práticas de reprodução induzida terão grandes chances de serem bem sucedidas quando os animais forem manejados logo após o início do período vitelogênico, identificado durante o inverno no presente estudo. Portanto, o manejo reprodutivo no início da primavera seria o mais indicado para que as fêmeas possam responder melhor à indução da ovulação e desova. Por outro lado, as fêmeas do G2 ($2n=48$) em cativeiro, parecem ter uma plasticidade maior, e mesmo perdendo a sincronia sazonal com o ambiente natural, adotam uma tática de se manter aparentemente vitelogênicas e aptas à reprodução induzida praticamente todo o ano. Tais características sugerem que *Astyanax fasciatus* com números diferentes de cromossomos possuem padrões reprodutivos diferentes tanto em cativeiro como em ambiente natural.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, CS.; HAHN, NS.; MARQUES, EE. Patterns of food resources use by two congeneric species of piranhas (*Serrasalmus*) on the upper Parana river floodplain. **Brazilian Journal of Biology**, v 63, n. 2, p. 177-182, 2003.
- AGOSTINHO,A.A.; MARQUES,E.E.; AGOSTINHO,C.S.; ALMEIDA,D.A.; OLIVEIRA,R.J.; MELO,J.R.B. Fish ladder of Lajeado Dam: migrations on one-way routes? **Neotropical Ichthyology**, v.5,n.2,p.121-130, 2007a.
- AGOSTINHO,A.A; GOMES,L.C.; PELICICE,F.M. Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil, 1ªed.,501p., 2007b.
- ANDRADE PM, BRAGA FMS. Reproductive seasonality of fish from a lotic stretch of the Grande River, High Paraná River Basin, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia** v.65, p.387–394, 2005.
- ARAÚJO,F.G. Adaptação do índice de integridade biótica usando a comunidade de peixes para o rio Paraíba do sul. **Revista Brasileira de Biologia**, v.58,n.4, p.547-558, 1998.
- BALDISSEROTTO,B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: UFSM, 2002.
- BARBIERI, G.; S. HARTZ & J.R. VERANI. 1996. O fator de condição e índice hepatossomático como indicadores do período de desova de *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819, da Represa do Lobo, São Paulo (Osteichthyes, Characidae). **Iheringia, Serie Zoologia**. Porto Alegre, v.81,p.97-100.
- 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.
- BOMBARDELLI,R.A.; SYPPERRECK,M.A.; SANCHES,E.A. Hormônio liberador de gonadotrofinas em peixes: aspectos básicos e suas aplicações. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, v.9, n.1, p.59-65, 2006.

- BRAGA,F.M.S. Reprodução de peixes (Osteichthyes) em afluentes do reservatório de volta grande, rio grande, sudeste do Brasil. **Iheringia Série Zoologia**, v.9, p.67-74, 2001.
- BROMAGE,N.; PORTER, M.; RANDALL, C. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. **Aquaculture**, v. 197, p. 63–98, 2001.
- CANEPELE,D.; HONJI,R.M.; HILSDORF,A.W.S.; MOREIRA,R.G. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, v.7, n.4, p.759-762, 2009.
- GARUTTI,V.; BRITSKI, HA. 1997. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae), com mancha umeral horizontalmenteovalada, da Bacia do Rio Guaporé, Amazônia. **Papeis Avulsos de Zoologia**, v. 40, p. 217-229.
- GURGEL, HCB. Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n.1, p. 131-135, 2004.
- GUERRA,M. **Introdução à Citogenética Geral**, Ed. Guanabara,1ªed.,142p.,1988.
- GUZMAN, J.M.; RUBIO, M. ORTIZ-DELGADO, J.B.; KLENKE, U.; KIGHT, K.; CROSS, I. SANCHEZ-RAMOS, I. RIAZA, A. REBORDINOS, L. SARASQUETE, C.; ZOHAR,Y.; MAÑANÓS, E.L. 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. **Comparative Biochemistry and Physiology, part A**. v.153, p. 266-277, 2009.
- HONJI,R.M.; NARCIZO,A.M.; BORELLA,M.I.; ROMAGOSA,E.; MOREIRA,R.G. Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, p.109–123, 2009.

- HONJI,R.M.; MELLO,P.H.; ARAÚJO,B.C.; RODRIGUES-FILHO,J.A.; HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA,R.G. Influence of spawning procedure on gametes fertilization success in *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae): Implications for the conservation of this species. **Neotropical Ichthyology**, v.9, n.2, p.363-370, 2011.
- LOWE-MCCONNEL,R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**.1.ed.São Paulo: EDUSP, 1999.
- LUBZENS, E.; YOUNG, G.; BOBE, J.; CERDÀ, J. Oogenesis in teleost: how fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, USA, v.165: p.367-389, 2010.
- MELAMED,P.; ROSENFELD,H.; ELIZUR,A. YARON,Z. Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.119C, p.325–338, 1998.
- MIGAUD,H.; DAVIE,A.; TAYLOR,J.F. Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. **Journal of Fish Biology**, v.76, p.27- 68, 2010.
- MIRANDA, M.O.T., RIBEIRO,L.P., 1997. Características Zootécnicas do Surubim *Pseudoplatystoma coruscans*. In: MIRANDA, M.O.T. (Org.), Surubim. IBAMA, Belo Horizonte, p. 43–56 (Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca, 1997.
- MONTEIRO L.B.B.; SOARES, M.C.; CATANHO, M.T.J.; HONCZARYK, A. Aspectos reprodutivos e perfil hormonal dos esteróides sexuais do pirarucu, *Arapaima gigas* (SCHINZ,1822), em condições de cativeiro. **Acta Amazônica**, v.40,n.3, 2010.
- MROSOVSKY, M. 1990. Rheostasis The Physiology of Change. Oxford University Press, New York.
- NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- NORRIS, D.O. (1997) Vertebrate Endocrinology. Academic Press, Inc. San Diego, USA. 3º edição. 634p Norris, D. O. **Vertebrate endocrinology**. Fourth edition. Elsevier. 550, 2007.

- PANSONATO-ALVES, J.C.; HILSDORF, A.W.S.; UTSUNOMIA, R.; SILVA, D.M.Z.A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosomal Mapping of Repetitive DNA and Cytochrome C Oxidase I Sequence Analysis Reveal Differentiation among Sympatric Samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae), Cytogenetic and genome research, 24, setembro 2013.
- PAZZA, R.; KAVALCO, K.F.; PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; BERTOLLO, L.A.C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae), part 3: analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, p.843-851, 2007.
- RESENDE, E.K. DE, CATELLA, A.C., NASCIMENTO, F.L., PALMEIRA, S. DA S., PEREIRA, R.A.C., LIMA, M. DE S., ALMEIDA, V.L.L. DE,. Biologia do curimbata (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil, Corumbá, MS EMBRAPA CPAP. **Boletim de Pesquisa**. V.2, p.75, 1995.
- Sato Y, Fenerich-Verani N.; Nunher A.P.O.; Godinho H.P.; Verani J.R. (Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. In: Godinho HP, Godinho AL (eds) Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. PUC-Minas, Belo Horizonte, 2003.
- SCHULZ, UH. and MARTINS JUNIOR, H. *Astyanax fasciatus* as Bioindicator of Water Pollution of Rio Dos Sinos, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 4, p. 615-622, 2000.
- SILVA, J.P.S.; MUELBERT, A.E.; OLIVEIRA, E.C.; FÁVARO, L.F. Reproductive tactics used by the Lambari *Astyanax* aff. *fasciatus* in three water supply reservoirs in the same geographic region of the upper Iguaçu River. **Neotropical Ichthyology**, v.8, n.4, p.885-892, 2010.
- SIMPSON, A.C. The fecundity of the plaice. **Fish Invest**, v.5, p.1–27, 1951.
- SOUZA, A.; CARVALHO, D.C.; MELO, D.C.; SEERIG, A.S.; OLIVEIRA, D.A.A.; RIBEIRO, L.P.; TEIXEIRA, E.A., CREPALD, D.V.; FARIA, P.M.C. A utilização de baixo número de matrizes em piscicultura: perda de recursos genéticos para programas de repovoamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.3, p.100-104, 2006.

- SWANSON,P; DICKEY,J.T.;CAMPBELL,B. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.28, p.53–59, 2003.
- TOLEDO-FILHO, S.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; GALHARDO,E.; DONOLA, E. Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. **Cadernos de Ictiogenética**.v.1, 21p.,1992.
- VAZZOLER,A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**, São Paulo: SBI, 169p, 1996.
- ZANIBONI-FILHO,E. ;WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.367-373, 2007.
- ZOHAR Y.; MYLONAS, C.C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. **Aquaculture**, p. 99–136, 2000.
- ZOHAR, Y.J.A.; MUÑOZ-CUETO,A. ELIZUR; O.KAH. Neuroendocrinology of reproduction in teleost Fish. **General and Compative Endocrinology**. N. 165, p.438-55, 2010.

8. ANEXOS

Anexo 1: PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Depois da fixação, o material deve ser mantido em etanol 70% por pelo menos 24 horas. Depois as amostras devem ser transferidas para cassetes histológicos, e identificadas a lápis. Colocadas nas jarras de vidro (no máximo cinquenta) do processador automático de tecidos (Leica – TP1020). A programação da máquina está especificada abaixo.

Step	Reagente	Tempo (minutos)
1	Etanol 95%	30
2	Etanol 95%	30
3	Etanol 100%	60
4	Etanol 100%	60
5	Etanol 100%	60
6	Etanol 100%	60
7	Xilol	30
8	Xilol	30
9	Xilol	30
10	Parafina	60
11	Parafina	60
12	Parafina	60

Tempo total: 9h45 min

EMBLOCAMENTO

1. Manter o material submerso em parafina fundida a 60°C (Histosec – MERCK).
2. Escolher uma fôrma de acordo com o tamanho do material. E aquecer a fôrma metálica em uma chama (bico de Bunsen ou lamparina).
3. Preencher a forma parcialmente com parafina fundida e, com o auxílio de uma pinça aquecida, colocar rapidamente o fragmento no fundo do recipiente, posicionando-o adequadamente.

4. Colocar o cassete destampado por cima da fôrma metálica e preencher completamente o recipiente com a parafina. Após este procedimento o material deve ser deixado sobre uma superfície gelada até que a parafina se torne sólida por completo.

COLORAÇÃO HEMATOXILINA & EOSINA

Uso de equipamento específico (Leica ST5010) para desparafinização, hidratação, coloração e desidratação das lâminas, de acordo com a tabela abaixo:

Para DESPARAFINAR e HIDRATAR		
1	Xilol	10 min.
2	Xilol	10 min.
3	Etanol 100%	5 min.
4	Etanol 100%	5 min.
5	Etanol 95%	5 min.
6	Etanol 70%	5 min.
7	Água destilada	5 min.

Para COLORAÇÕES em HE		
1	Hematoxilina de Harris	10 min.
2	Água de torneira corrente	10 min.
3	Eosina amarelada	1 min.
4	Água destilada	30 seg.
5	Água destilada	30 seg.

Para DESIDRATAR/MONTAR		
1	Etanol 95%	1 min.
2	Etanol 100%	5 min.
3	Etanol 100%	5 min.
4	Etanol-xilol (1:1)	5 min.
5	Xilol I	5 min.
6	Xilol II	5 min.

Obs. o tempo da hematoxilina pode variar de acordo com o desgaste do corante: quanto mais novo, deixar menos tempo (p. ex. 5 min.), quanto mais antigo deixar por mais tempo (p.ex. 10 min.).

Anexo 2: INSTRUÇÕES DO FABRICANTE QUANTO A UTILIZAÇÃO DOS KITS DE ESTRADIOL

1. Pipetar 25 µl das soluções padrões em duplicata em cada poço correspondente.
2. Pipetar 25 µl das amostras em duplicata em cada poço correspondente. Até preencher a placa.
3. Após essas pipetagens, pipetar 200µl em todos os poços de conjugado enzimático.
4. Incubar em temperatura ambiente em *shaker* por 120 minutos.
5. Após este período, jogar o conteúdo dos poços fora e lavar 3 vezes com 200µl de wash buffer.
6. Pipetar 100µl da solução substrato em cada poço.
7. Incubar em *shaker* por 15 minutos em temperatura ambiente.
8. Pipetar 50µl da solução de parada em cada poço.