RENATO MASSAAKI HONJI

Caracterização endócrina durante o ciclo reprodutivo
da tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes:
Characidae), em três ambientes distintos:
natural, impactado e cativeiro.

São Paulo

2007

RENATO MASSAAKI HONJI

Caracterização endócrina durante o ciclo reprodutivo
da tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes:
Characidae), em três ambientes distintos:
natural, impactado e cativeiro.

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

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira

São Paulo

2007

Ficha Catalográfica

Honji, Renato M.

Caracterização endócrina durante o ciclo reprodutivo da tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae), em três ambientes distintos: natural, impactado e cativeiro. 190p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2007. Departamento de Fisiologia.

1 – *Salminus hilarii*; 2 – Ciclo reprodutivo; 3 – Migração reprodutiva; 4 – Controle endócrino; 5 – Esteróides; 6 – Adeno-hipófise.

Comissão Julgadora

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

Orientador (a)

Dedico este trabalho:

- aos meus pais Nelson Massato Honji e Shizuko Honji, que sempre confiaram em mim e me apoiaram durante toda a minha vida e principalmente por acreditarem na minha pesquisa;

- à vida dos meus peixes que sem eles essa pesquisa seria impossível de ser realizada.

Algumas palavras...

Ao colega Biologista do ano 2007

Se você, prezado colega, ficou 32 anos às margens de um rio, de um lago ou nas entranhas de uma floresta... pesquisando... reunindo dados e mais dados sobre uma questão da Natureza.

Se você se ocupou, de modo útil, durante todo o seu tempo e com a mente no sentido elevado, tentando compreender a Vida.

Se você conseguiu, laboriosamente, redigir um trabalho, um livro, com a alma cheia de esperanças.

Se você se preocupou com os recursos naturais renováveis do nosso País, visando compreendê-los e transmitir, com os seus estudos, informações úteis aos seus semelhantes, para um País e para um Planeta que sempre estão carentes de alimentos.

Se você, confiantemente, procurou amigos, procurou pessoas com poder executivo para entenderem e apoiarem a sua obra... e quase todos eles, com um sorriso de malícia, lhe devolveram o seu trabalho... e lhe disseram: - que pena! Não temos recursos para publicá-lo... ou que uma vírgula não estava no lugar certo... continue a lutar, a lutar, até conseguir ver o seu desiderato satisfeito: - a publicação da sua obra!

Lute e insista por um ano, por dez e por doze anos... e muito mais, se for preciso, porque na história dos homens, a ocorrência dos fatos chega a ser quase uma rotina através do tempo: - poucos, verdadeiramente, ajudam e cooperam altruisticamente; grande parte das pessoas, corroídas por inveja, por ciúmes e por outros sentimentos pobres, procuram sempre atrapalhar as coisas boas e que estão fora do alcance delas!

Não se engane com a posição das pessoas, pois, com frequência, aquelas que estão no alto e que poderiam nos ajudar... são as primeiras que mais nos atrapalham.

Colega do ano de 2007: - lute e persista, porque você há de vencer! Assim aconteceu comigo.

Escrito por M. P. de Godoy
Pirassununga, 16/01/1975

Agradecimentos

Deixei essa etapa dos agradecimentos para o final, pois, pensei que seria a fase mais fácil do meu mestrado a ser concluída e, que seria um momento sem estresse e “cansaço”. Engano meu... esta etapa da minha vida profissional e de certa forma da minha vida pessoal, esteve dentro de mim por alguns anos e com certeza várias pessoas acompanharam desde o início essa grande história da minha vida. De um modo geral, fica impossível de agradecer a todas as pessoas que conviveram comigo e colaboraram com esse trabalho, desde o início até esta etapa final. As emoções são muitas e intensas, deixo aqui apenas o ponto de partida dessa lista que jamais chegaria ao fim...

À Deus, pela ótima família, pela minha saúde e por me dar essa oportunidade de conhecer e trabalhar com pessoas tão especiais que ajudaram e muito para a realização deste trabalho e muito mais...

À professora Dra. Renata Guimarães Moreira pela orientação, incentivo e dedicação nesses anos de convivência. Desde o início desta caminhada vem me ensinando com muita honra e dignidade a ser uma pessoa melhor. Agradeço muito por você ter acreditado e investido em mim. Além de tudo isso, pela disponibilidade a todo o momento, mostrou-se uma amiga e companheira de todas as horas. Não há como agradecer esses anos de convivência apenas com palavras, mas somente honrando-a. Deixo aqui expresso toda a minha admiração e meu respeito a

essa incrível pessoa que é a Profa. Renata. Estaremos juntos novamente por pelo menos quatro anos no meu doutorado.

À professora Dra. Maria Inês Borella, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB - USP), pela disponibilidade e colaboração neste trabalho e, por abrir as portas do seu laboratório para a realização dos cortes histológicos e das reações imuno-histoquímica, além disso, por acompanhar de perto todos os passos do meu trabalho desde o início até o fim, sempre com muito carinho, dedicação e por fazer a hora do café um momento inesquecível.

Aos professores do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB - USP) pelas disciplinas ministradas, conselhos e ensinamentos durante a minha caminhada profissional. Especialmente, à Dra. Sílvia Cristina Ribeiro (profa. Silvinha), ao Dr. José Guilherme (Zegui), Dra. Marilene Bianconcini e Dr. Gilberto Xavier, pelos grandes momentos inesquecíveis que passei neste departamento e o mais importante, pelos ensinamentos e amizade. Gostaria de agradecer também o professor Dr. José Eduardo Bicudo, pelo uso das dependências de seu laboratório e da sala 305.

Ao Coordenador do Programa de Pós-graduação, professor Dr. Gilberto Fernando Xavier, pela amizade e pelos serviços burocráticos quando necessários.

Aos alunos do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos do Instituto de Biociências da USP, pelos grandes momentos juntos em diversas situações que não deixaram a minha “vida” cair em uma rotina, por exemplo, na praia, na casa de campo da professora, nas baladinhas e, é claro no laboratório. São eles: Amanda (little mandy), Aline (brigadeiro), Juliane (Xusssssssuzuki), Cristiele (Michele), Clodoaldo (Clô), Carlos Eduardo (Kadu), Vanessa (Van), Carlos Eduardo (Jaboti), Jandyr (Jajá-Jacenyrr), Paulo (Druskinha), Larissa (Lari), Tiago e Renato Melo. Não poderia deixar de agradecer também “o agregado” do laboratório, o Sr. Gabriel Inácio. Gostaria de agradecer em especial à Juliane Suzuki pela grande ajuda nas análises dos esteróides gonadais, pelos momentos inesquecíveis na nossa viagem ao Canadá, pelos títulos “Honra ao Mérito” que recebemos em Congressos e principalmente pela eterna amizade.

À todos os funcionários do Instituto de Biociências da USP pelos serviços prestados, em especial a Sra. Irany pelo café e amizade, à Roseli Santos (secretária do Departamento de Fisiologia) e Érika Takamoto (secretária do Programa de Pós-graduação) do Instituto de Biociências da USP pelos serviços burocráticos, ajuda quando necessário e pela grande amizade. Agradeço também a todos os funcionários da biblioteca do Instituto de Biociências da USP pelas bibliografias quando necessárias.

*Aos amigos da Pós-graduação do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP, em especial ao Bruno Blotta (BBB), Marina Granado (tia Marina), Cíntia Etsuko (monitora do mal), Breno Santos (o *Help* no programa *Matlab*), João Gimenez (“*vamos trabalhar meu*”), Arnaldo Cheixas (Dr. Arnaldo), Lucas Ribeiro (o enzimático) e Fernando (figurinha), pela eterna amizade, pelo auxílio em diversos momentos e pelos grandes momentos no laboratório, na copa, nos corredores e na salinha 305.*

Aos amigos do Laboratório de Endocrinologia de Peixes do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, são eles: Maria Inês Borella, Cruz Alberto, Renato Barbieri, Sérgio Ricardo, Suelly Pereira, Rafael Nóbrega e Joyce. Gostaria de agradecer especialmente ao Cruz Alberto (Junior) pelo ensinamento nos cortes histológicos, coloração e constante ajuda durante o processamento das amostras e ao Rafael (Sr. Comédia) pelo ensinamento nas reações imuno-histoquímica. Valeu galera pela amizade, ajuda e felicidades.

À minha amiga Ms. Vanessa Linhares de Andrade pela amizade, pelas disciplinas cursadas e pelos momentos inesquecíveis durante as coletas, nos laboratórios e nas baladinhas.

À professora Dra. Elizabeth Romagosa do Instituto de Pesca de São Paulo, pelas sugestões nas análises, pelos ensinamentos na saída de campo em Paríquera-Açú e pela

oportunidade de poder trabalhar em projetos paralelamente ao mestrado.

Não podia deixar de agradecer aos eternos amigos e amigas do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP), que foi a minha “primeira casa científica”, pelos ensinamentos, pela formação acadêmica e de campo durante os embarques científicos. Agradeço muito à Dra. Carmen Wongtschowski e ao Dr. André Martins Vaz dos Santos pela orientação nos meus primeiros passos como pesquisador científico (devo muitas coisas a essas grandes pessoas!!!).

Gostaria de deixar expresso a minha grande admiração e respeito aos professores de graduação que tive na Universidade Santa Cecília (UNISANTA): Dr. Luiz Alberto Zavala Camín, Dr. Otto Bismarck Fazzano Gadig, Dr. Laércio José Gerbi e Dr. André Martins Vaz dos Santos.

Ao Departamento de Águas e Energia Elétrica (DAEE) pelo suporte logístico, financeiro e técnico. Agradeço também pela disponibilização da Piscicultura de Ponte Nova para a realização do projeto.

Aos pescadores Sr. Cláudio Duque, Sr. Milton e Sr. Denésio pelos peixes capturados e que sem eles, esse trabalho não seria possível. Agradeço especialmente ao Sr. Milton por deixar os dias de coleta na Piscicultura de Ponte Nova um momento de alegria, descontração e de felicidades.

A Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) pelo suporte logístico, técnico e financeiro.

Aos alunos do Laboratório de Genética de Peixes e Aquicultura da UMC, em especial ao professor Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf (Tio Alexandre), pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida (Processo: 134451/2005-8).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro do projeto (Processo: 01/10483-1).

Agradeço muito a minha família que sempre esteve presente, e por agüentar o meu “estresse” todos os dias. Sem vocês eu não seria nada. AMO TODOS VOCÊS... Meu pai Nelson, minha mãe Shizuko, minhas irmãs Midori, Mieko, Andréa e Sue. Minha afilhada Tammy, e meu sobrinho Lucas e minha sobrinha Aya.

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

Muito obrigado...

Índice

Lista de Abreviações	i
Lista de Tabelas	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Anexos	xix
Resumo	xx
Abstract	xxii
1 – Introdução	1
1.1 – Revisão bibliográfica	4
1.1.1 – Fisiologia da reprodução em peixes (eixo hipotálamo-hipófise-gônadas)	4
1.1.2 – Hipotálamo, hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH)	6
1.1.3 – Hipófise, células produtoras de gonadotropinas (GtHs)	7
1.1.4 – Gônadas, caracterização ovariana e testicular	10
1.2 – Breve descrição da espécie e a importância de <i>Salminus hilarii</i>	15
2 – Objetivos	18
2.1 – Objetivo geral	18
2.1.1 – Objetivos específicos	18
3 – Material e Método	20
3.1 – Material biológico (espécie estudada)	20

3.2 – Captura do material biológico	20
3.3 – Obtenção de dados biológicos	23
3.3.1 – Processamento pós-captura e biometria	23
3.3.2 – Análise macroscópica das gônadas	24
3.3.3 – Análise macroscópica da hipófise	29
3.4 – Histologia de gônadas (análise microscópica) de <i>Salminus hilarii</i>	30
3.5 – Histologia de hipófise (análise microscópica) de <i>Salminus hilarii</i>	31
3.6 – Imuno-histoquímica das células adeno-hipofisárias de <i>Salminus hilarii</i>	32
3.7 – Determinação dos esteróides gonadais, testosterona, 17 β -estradiol e 17 α -hidroxiprogesterona de <i>Salminus hilarii</i> durante o ciclo reprodutivo e entre os grupos experimentais	35
3.7.1 – Validação dos “kits” comerciais de ELISA	36
3.8 – Análise de dados	37
4 – Resultados	38
4.1 – Caracterização dos lotes experimentais (dados biológicos)	38
4.1.1 – Amostras	38
4.2 – Análise macroscópica e microscópica das gônadas de <i>Salminus hilarii</i>	40
4.2.1 – Descrição macroscópica e microscópica dos ovários	40
4.2.2 – Descrição macroscópica e microscópica dos testículos	48
4.3 – Análise macroscópica e microscópica da hipófise de <i>Salminus hilarii</i>	52
4.3.1 – Descrição macroscópica da hipófise	52
4.3.2 – Descrição histoquímica e imuno-histoquímica da hipófise	52
4.3.3 – Alterações morfológicas, intensidade de imunorreatividade e frequência de células produtoras de hormônio de crescimento,	

somatolactina e prolactina durante o ciclo reprodutivo de <i>Salminus hilarii</i>	57
4.4 – Perfil plasmático dos esteróides gonadais: testosterona, 17 β -estradiol e 17 α -hidroxiprogesterona de <i>Salminus hilarii</i> durante o ciclo reprodutivo e entre os grupos experimentais	61
4.4.1 – Validação dos “kits” comerciais de ELISA	63
5 – Discussão	64
5.1 – Amostras (dados biológicos)	64
5.2 – Aspectos do ciclo reprodutivo e Índice gonadosomático de <i>Salminus hilarii</i>	66
5.2.1 – Características reprodutivas	66
5.2.2 – Caracterização do desenvolvimento ovariano	68
5.2.3 – Caracterização do desenvolvimento testicular	77
5.3 – Caracterização das células adeno-hipofisárias de <i>Salminus hilarii</i>	80
5.3.1 – Família derivada de proopiomelanocortina: adrenocorticotropina e a melanotropina	82
5.3.2 – Família prolactina/somatotropina: prolactina, hormônio de crescimento e somatolactina	84
5.3.3 – Variações das células da Família prolactina/somatotropina: durante o ciclo reprodutivo em <i>Salminus hilarii</i>	87
5.3.4 – Família dos hormônios glicoprotéicos: tireotropina e gonadotropinas	93
5.3.5 – Dualidade das células gonadotrópicas de <i>Salminus hilarii</i> : uma ou duas células produtoras de hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante?	98
5.4 – Perfil plasmático dos esteróides gonadais de <i>Salminus hilarii</i> em relação ao ciclo reprodutivo e entre os grupos experimentais	100
6 – Conclusões	105
7 – Referências bibliográficas	108

8 – Tabelas	131
9 – Figuras	139
10 – Anexos	180

Lista de Abreviações

IGS – Índice gonadossomático
W_t – Massa corpórea total
L_t – Comprimento total
E₂ – 17 α -Estradiol
T – Testosterona
17 α -OHP – 17 α -hidroxiprogesterona
17 α , 20 β -DHP – 17 α , 20 β -dihidroxy-4-pregnen-3-one
20 β -HSD – 20 β -hidroxiesteróide desidrogenase
ELISA - Elisaimunoensaio
MIS – Hormônio indutor da maturação final
NH – Neuro-hipófise
AD – Adeno-hipófise
GtH – Gonadotropina
GtHs – Gonadotropinas
FSH –Hormônio folículo estimulante
LH – Hormônio luteinizante
GH – Hormônio de crescimento
sGH – Anticorpo de Hormônio de crescimento de salmão
TSH – Hormônio estimulante da tireóide
PRL – Prolactina
sPRL – Anticorpo de prolactina de salmão
ACTH – Hormônio adrenocorticotrópico
SL – Somatolactina
sSL – Anticorpo de somatolactina de salmão
MSH – Hormônio estimulante de melanina
AVT – Arginina-vasotocina
IST – Isotocina
MCH – Hormônio concentrador de melanina
GnRH – Hormônio liberador de gonadotropina
sGnRH – Hormônio liberador de gonadotropina (*salmon*)
cGnRH – Hormônio liberador de gonadotropina (*chicken II*)

sbGnRH – Hormônio liberador de gonadotropina (*seabream*)

pjGnRH – Hormônio liberador de gonadotropina (peixe rei)

ctGnRH – Hormônio liberador de gonadotropina (*catfish*)

POMC – Proopiomelanocortina

IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina

SABC – *Streptavidin-biotin-peroxidase complex*

PBS – *Phosphate Buffer Saline*

PAS – Ácido periódico de Schiff

PPD – *Proximal pars distalis*

RPD – *Rostral pars distalis*

PI – *Pars intermedia*

FPOs – Folículo pós-ovulatório

Lista de Tabelas

Tabela 01: *Salminus hilarii* – Anticorpos primários utilizados na hipófise de *Salminus hilarii*.

132

Tabela 02: *Salminus hilarii* – Distribuição morfométrica e ponderal por estágio de maturação gonadal. Grupo experimental 01 (ambiente natural).

132

Tabela 03: *Salminus hilarii* – Distribuição morfométrica e ponderal por estágio de maturação gonadal. Grupo experimental 02 (ambiente impactado por barragem).

133

Tabela 04: *Salminus hilarii* – Distribuição morfométrica e ponderal por estágio de maturação gonadal. Grupo experimental 03 (ambiente de cativeiro).

133

Tabela 05: *Salminus hilarii* – Distribuição mensal dos estádios do ciclo reprodutivo por grupo experimental.

134

Tabela 06: *Salminus hilarii* – Descrição estatística do Índice gonadosomático (IGS) por sexo, por estágio de maturação gonadal e por grupo experimental (01 – ambiente natural; 02 – ambiente impactado por barragem; 03 – ambiente de cativeiro). Média $\pm$ erro padrão.

134

Tabela 07: *Salminus hilarii* – Número de exemplares capturados (Nº total) e número de hipófises utilizadas nas análises histoquímica e imuno-histoquímica por estágio de maturação gonadal e grupo experimental. Comprimento total (L_t)

e massa corpórea total (W_t) das fêmeas utilizadas.

135

Tabela 08: *Salminus hilarii* – Porcentagem de células marcadas com anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH) por grupo experimental e estágio de maturação gonadal.

135

Tabela 09: *Salminus hilarii* – Porcentagem de células marcadas com anti-somatolactina de salmão (sSL) por grupo experimental e estágio de maturação gonadal.

136

Tabela 10: *Salminus hilarii* – Concentração plasmática (pg/ml) de esteróides gonadais (média $\pm$ erro padrão), por grupo experimental por estágio de desenvolvimento gonadal. Número de fêmeas (N); estradiol (E_2); testosterona (T) e 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP).

137

Tabela 11: *Salminus hilarii* – Coeficientes de variação intraensaio para os esteróides gonadais: estradiol (E_2); testosterona (T) e 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP).

138

Lista de Figuras

Figura 01: *Salminus hilarii* – Material biológico e ambientes utilizados no presente trabalho para formar os grupos experimentais. **A)** *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characiformes). **B,C)** Rio Tietê, ponto de coleta do grupo experimental 01 (ambiente natural). **B)** Trecho do rio com água corrente (ambiente lótico). **C)** Detalhe na captura dos animais. Arte de pesca: vara e isca viva (pesca artesanal). **D,E)** Rio Tietê, ponto de coleta do grupo experimental 02 (ambiente impactado por barragem). **D)** Barragem de Ponte Nova. **E)** Detalhe do Rio Tietê, continuação deste Rio à jusante da barragem de Ponte Nova (ambiente impactado por barragem). Arte de pesca: vara e isca viva e tarrafas. **F,G)** Viveiros da Piscicultura da Barragem de Ponte Nova, Salesópolis – SP (ambiente de cativeiro). **F)** Local de estocagem dos animais do grupo experimental 03. **G)** Detalhe do viveiro da Piscicultura da Barragem de Ponte Nova, utilizado no presente projeto (100m²). A captura dos animais deste grupo foi realizada com tarrafas e rede de arrasto.

140

Figura 02: *Salminus hilarii* – Área de abrangência do presente projeto, ponto de coleta 01 (Rio Tietê, ambiente lótico), ponto de coleta 02 (saída da água da Barragem de Ponte Nova, ambiente impactado) e ponto de coleta 03 (Piscicultura de Ponte Nova, ambiente de cativeiro).

142

Figura 03: *Salminus hilarii* – A hipófise da tabarana. **A)** Vista dorsal da região cefálica da tabarana, apresentando o encéfalo (seta azul) e a hipófise (seta vermelha). **B)** Esquema da posição de captura de imagens nas reações imuno-histoquímicas para a avaliação quantitativa. Barra: 300µm. “*Pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD); “*proximal pars distalis*” (PPD). Anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH).

142

Figura 04: *Salminus hilarii* – Diagrama de dispersão e parâmetros estimados da equação entre os dados de comprimento total (L_t) e massa corpórea total (W_t). Exemplos capturados no ambiente natural (grupo experimental 01). N = 25.

143

Figura 05: *Salminus hilarii* – Diagrama de dispersão e parâmetros estimados da equação entre os dados de comprimento total (L_t) e massa corpórea total (W_t). Exemplos capturados no ambiente impactado por barragens (grupo experimental 02). N = 23.

143

Figura 06: *Salminus hilarii* – Diagrama de dispersão e parâmetros estimados da equação entre os dados de comprimento total (L_t) e massa corpórea total (W_t). Exemplos capturados no ambiente de cativeiro (grupo experimental 03). N = 23.

143

Figura 07: *Salminus hilarii* – Aspecto macroscópico de ovários de tabarana. **A)** Ovários no estágio repouso (seta azul). **B)** Ovários no estágio maturação inicial (seta azul). **C)** Ovários no estágio maduro (seta azul). **D)** Ovários no estágio regressão/esgotado (seta azul). **E)** Detalhe macroscópico de ovários de tabarana em animais coletados no ambiente natural no estágio maduro. **F)** Detalhe macroscópico de ovários de tabarana em animais coletados no cativeiro no estágio maturação avançada. Notar a diferença de coloração nos ovários entre os grupos experimentais (E-F). **A-E:** Exemplos capturados no ambiente natural. **F:** Exemplo capturado no cativeiro.

144

Figura 08: *Salminus hilarii* – Índice gonadosomático (IGS), por estágio de maturação gonadal e por grupo experimental. Valores de IGS apenas para as fêmeas. ^{a,b} Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo estágio e ambientes diferentes; * Símbolos diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo ambiente e

estádios diferentes.

145

Figura 09: *Salminus hilarii* – Secções histológicas apresentando as diferentes fases de desenvolvimento oocitário de tabaranas coletadas no ambiente natural (grupo 01). Reações histoquímicas. **A)** Oócitos na fase cromatina-nucléolo (oogônias). Observa-se que as oogônias estão reunidas em ninhos (seta). **B)** Oócitos na fase perinucleolar. Oócitos numa fase perinucleolar mais inicial (cabeça de seta) e numa fase mais avançada (seta). **C)** Detalhe do oócito na fase perinucleolar mais avançada, evidenciando o núcleo (N) com múltiplos nucléolos na periferia (setas). **D)** Detalhe do oócito perinucleolar mais inicial e uma fina camada folicular (seta). **E)** Detalhe do oócito perinucleolar mais avançada. Nota-se um epitélio folicular mais espesso (seta). **F)** Oócitos na fase cortical alveolar, podendo-se notar a presença de deposição lipídica na periferia do oócito (setas) e a zona radiata (asterisco). **G)** Oócitos na fase vitelogênica (com núcleo central). **H)** Oócitos na fase madura (setas). Pode observar o núcleo desorganizado (cabeça de seta) e a micrópila (círculo vermelho). **A-H:** Hematoxilina e Eosina. **A,B,D,E,F:** Barra = 100µm. **C:** Barra = 20µm. **G,H:** Barra = 300µm.

146

Figura 10: *Salminus hilarii* – Continuação das secções histológicas apresentando as diferentes fases de desenvolvimento oocitário de tabaranas coletadas no ambiente natural (grupo 01). Reações histoquímicas. **A)** Detalhe de um oócito, evidenciando a micrópila (seta) e as estrias radiais da zona radiata (cabeça de seta). **B)** Detalhe dos oócitos na fase vitelogênica, evidenciando o citoplasma repleto de grânulos de vitelo (GV) e o envoltório folicular: zona radiata (cabeça de seta) e camada folicular (seta). **C)** Detalhe de um oócito na fase madura, evidenciando os grânulos de vitelo (GV), núcleo desorganizado (círculo) e nucléolos na periferia do núcleo (cabeça de seta). **D)** Oócitos na fase vitelogênica (cabeça de seta) e folículo pós-ovulatório (seta). **E)** Oócitos atresícos evidenciando as características de início de atresia. Notar a deformação (espessamento) da zona radiata (cabeça de seta) e desorganização dos grânulos de vitelo (seta). **F)** Detalhe de um oócito atresíco

(seta) em um estágio mais avançado de reabsorção. **A-F:** Hematoxilina e Eosina. **A:** Barra = 20µm. **B:** Barra = 50µm. **C,F:** Barra = 100µm. **D,E:** Barra = 300µm.

148

Figura 11: *Salminus hilarii* – Secções histológicas apresentando as diferentes escalas de maturação gonadal de tabaranas coletadas no ambiente natural. Reações histoquímicas. **A)** Aspecto microscópico de um lobo de ovário no estágio repouso. **B)** Aspecto microscópico de um lobo de ovário no estágio maturação inicial. **C)** Aspecto microscópico de um lobo de ovário no estágio maduro. **D)** Aspecto microscópico de um lobo de ovário no estágio regressão/esgotado. **A-D:** Hematoxilina e Eosina. **A,C,D:** Barra = 300µm. **B:** Barra = 100µm.

150

Figura 12: *Salminus hilarii* – Aspecto macroscópico de testículos de tabarana. **A)** Testículos no estágio regressão (seta azul). **B)** Testículos no estágio maduro (seta azul). **C)** Detalhe macroscópico de testículos de tabarana no estágio regressão. **D)** Detalhe macroscópico de testículos de tabarana no estágio maduro. **A-D:** Exemplos capturados no ambiente natural (Rio Tietê, grupo experimental 01).

151

Figura 13: *Salminus hilarii* – Índice gonadosomático (IGS), por estágio de maturação gonadal e por grupo experimental. Valores de IGS apenas para os machos.

151

Figura 14: *Salminus hilarii* – Secções histológicas apresentando as diferentes fases de desenvolvimento testicular e as diferentes escalas de maturação gonadal de tabaranas coletadas no ambiente natural (grupo 01). Reações histoquímicas. **A)** Células testiculares da tabarana: espermatogônias (SG), espermatócitos (SC) e espermatídes (ST). **B)** Ductos testiculares com espermatozoides (SZ) e cistos. **C)** Célula de Sertoli (S), notar os finos

prolongamentos dessa célula (cabeça de seta), espermatogônias (SG) e espermatídes (ST). **D)** Tecido intersticial (TI), evidenciando as células de Leydig (asterisco). **E)** Epitélio germinativo descontínuo (EGD) e espermatozóides (SZ). **F)** Epitélio germinativo contínuo (EGC), ducto (D) e tecido intersticial (TI). **G)** Aspecto microscópico de secção transversal de testículo, evidenciando os ductos com espermatozóides residuais (cabeça de seta). Estádio regressão. **H)** Aspecto microscópico de secção transversal de testículo, evidenciando os ductos (D) repletos de espermatozóides (SZ). Estádio maduro. **A-H):** Hematoxilina e Eosina. **A,C,D):** Barra = 20µm. **B,E,F):** Barra = 100µm. **G,H):** Barra = 300µm.

152

Figura 15: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações histoquímicas. **A-B)** “*pars intermedia*” (PI), “*rostral pars distalis*” (RPD), “*proximal pars distalis*” (PPD) e neurohipófise (NH). **C,D)** Região da adeno-hipófise: “*rostral pars distalis*”. **C)** Células produtoras de adrenocorticotropina (ACTH) (cabeça de seta). Observa-se um ramo da neuro-hipófise (NH). **D)** Células produtoras de prolactina (PRL) (cabeça de seta). **A,C,D):** Tricrômio de Mallory. **B):** Ácido Periódico de Schiff (PAS). **A,B):** Barra = 300µm. **C,D):** Barra = 20µm.

154

Figura 16: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações histoquímicas. **A)** Região da adeno-hipófise, “*rostral pars distalis*” apresentando as células produtoras de prolactina (seta) e as células produtoras de adrenocorticotropina (cabeça de seta). **B,C,D,E,F)** Região da adeno-hipófise: “*proximal pars distalis*”. **B)** Células produtoras de hormônio de crescimento (cabeça de seta). **C)** Células produtoras de gonadotropina (cabeça de seta). Reação positiva com Ácido periódico de Schiff (PAS). **D,E)** Células produtoras de gonadotropina (cabeça de seta). **F)** Região da adeno-hipófise, “*proximal pars distalis*” apresentando as células produtoras de hormônio de crescimento (seta) e as células produtoras de gonadotropinas (cabeça de seta). Neuro-hipófise (NH). **A,B,D,E,F):** Tricrômio de Mallory. **C):** Ácido Periódico de

Schiff (PAS). **A-F**: Barra = 20µm.

155

Figura 17: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações histoquímicas. **A-D**) Região da adeno-hipófise: “*pars intermedia*” (PI). **A**) Células produtoras de melanotropina (cabeça de seta). **B**) Células produtoras de somatolactina (cabeça de seta). **C**) Células produtoras de somatolactina (cabeça de seta). Reação positiva com Ácido Periódico de Schiff. **D**) Região da adeno-hipófise “*pars intermedia*”: apresentando as células produtoras de somatolactina (cabeça de seta) e as células produtoras de melanotropina (seta). **A,B**: Tricrômio de Mallory. **C,D**: Ácido Periódico de Schiff (PAS). **A,B,C,D**: Barra = 20µm.

156

Figura 18: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A,C,F**) Regiões da adeno-hipófise: “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A**) Resultado da reação com o anti-prolactina de salmão (sPRL). Notar a forte marcação de anti sPRL apenas na região da RPD. **B**) Detalhe da reação com o anti sPRL na RPD. **C**) Resultado da reação com o anti-somatolactina de salmão (sSL). Notar a forte marcação de anti sSL na PI. **D**) Detalhe da reação com o anti sSL na PI. Observar a presença de aglomerados de células imunorreativas e a forte marcação de anti sSL. **E**) Resultado da reação com o anti sSL na PI, notar a reação cruzada com as células gonadotrópicas na PPD (cabeça de seta). **F**) Resultado da reação com o anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH). Notar a forte marcação de anti sGH apenas na região da PPD. **A,C,F**: Barra = 300µm. **B,D**: Barra = 20µm. **E**: Barra = 50µm.

157

Figura 19: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-B**) “*Proximal pars distalis*”. **A**) Detalhe da reação com anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH). Notar a presença de aglomerados de células imunorreativas (cabeça de seta). **B**) Resultado da reação de imuno-histoquímica com anti sGH, evidenciando as

células imunorreativas isoladas (cabeça de seta). **C,D,E,F)** Dualidade das células gonadotrópicas. Anticorpos utilizados: anti- β -hormônio folículo estimulante de salmão (β -FSH) e anti- β -hormônio luteinizante de salmão (β -LH). Anticorpo doado pelo prof. Kawauchi. **C,D)** Regiões da adeno-hipófise: “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). Notar que, com o anticorpo anti β -FSH, as secções histológicas seriadas apresentam mais marcação de fundo (background) do que com anti β -LH. **C)** Resultado da reação com anti β FSH. Notar a fraca reação da imuno-histoquímica na região PPD. **D)** Resultado da reação com anti β LH. Notar a fraca reação da imuno-histoquímica na região PPD. **E)** Detalhe da reação com anti β FSH (cabeça de seta). Notar a fraca reação das células produtoras de hormônio folículo estimulante da tabarana com este anticorpo de salmão. **F)** Detalhe da reação com anti β LH (cabeça de seta). Notar a fraca reação das células produtoras de hormônio luteinizante da tabarana com este anticorpo de salmão. **A,B:** Barra = 20 μ m. **C,D:** Barra = 300 μ m. **E,F:** Barra = 50 μ m.

158

Figura 20: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-H)** Dualidade das células gonadotrópicas. **A,B,E,F)** Regiões da adeno-hipófise: “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A-D)** Anticorpos utilizados: anti- β -hormônio folículo estimulante de salmão (β -FSH) e anti- β -hormônio luteinizante de salmão (β -LH). Anticorpo doado pelo prof. Dr. Shimizu. **A)** Resultado da reação com anti β FSH. Notar a pequena reação na região PPD. **B)** Resultado da reação com anti β LH. Notar a pequena reação na região PPD, além de se observar que, com o anticorpo anti β LH de salmão, as secções histológicas apresentam mais marcação de fundo (background) do que com anti β FSH de salmão. **C)** Detalhe da reação com anti β FSH (cabeça de seta), evidenciando a fraca reação das células produtoras de FSH da tabarana. **D)** Detalhe da reação com anti β LH (cabeça de seta), evidenciando a fraca reação das células produtoras de LH da tabarana. **E-F)** Anticorpos utilizados: anti- β -hormônio folículo estimulante de *mummichog* (β -FSH) e anti- β -hormônio luteinizante de *mummichog* (β -LH). **E)** Resultado da reação com anti β FSH. Notar a falta de reação na região PPD. **F)** Resultado da reação com

anti β LH. Notar a falta de reação na região PPD, além de se observar que, com o anticorpo anti β FSH e anti β LH ambos de *mummichog*, as secções histológicas seriadas não apresentam diferença na marcação de fundo (background). **G)** Detalhe da reação com anti β FSH (cabeça de seta), evidenciando a falta de reação das células produtoras de hormônio folículo estimulante da tabarana. **H)** Detalhe da reação com anti β LH (cabeça de seta), evidenciando a falta de reação das células produtoras de hormônio folículo estimulante da tabarana. **A,B,E,F:** Barra = 300 μ m. **C,D:** Barra = 50 μ m. **G,H:** Barra = 20 μ m.

160

Figura 21: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-F)** Dualidade das células gonadotrópicas. **A,C,D)** Regiões da adeno-hipófise: “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A-B)** Anticorpo utilizado: anti- α -gonadotropina de *mummichog* (α GtH). **A)** Resultado da reação com anti α GtH, notar a pequena reação da imuno-histoquímica na região PPD. **B)** Detalhe da reação imuno-histoquímica com anti α GtH, evidenciando a pequena reação da imuno-histoquímica na região PPD. **C-F)** Anticorpo utilizado: anti- α - β -gonadotropina de carpa (α - β GtH) e anti- β -gonadotropina (β GtH). Anticorpo doado pelo prof. Dr. Mancera. **C)** Resultado da reação com anti α - β GtH. **D)** Resultado da reação com anti β GtH. Notar a reação da imuno-histoquímica na região PPD. **E)** Detalhe da reação com anti α - β GtH (cabeça de seta), evidenciando a fraca reação. **F)** Detalhe da reação com anti β GtH (cabeça de seta), evidenciando a fraca reação. **A,C,D:** Barra = 300 μ m. **B:** Barra = 20 μ m. **E,F:** Barra = 50 μ m.

162

Figura 22: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-D)** Dualidade das células gonadotrópicas. Anticorpo utilizado: anti- α - β -gonadotropina de carpa (α - β GtH) e anti- β -gonadotropina (β GtH). **A-B)** Resultado das reações imuno-histoquímicas em secções histológicas adjacentes. **A)** com anti α - β GtH (cabeça de seta). **B)** com anti β GtH (cabeça de seta). Notar que existe um padrão de

imunorreatividade diferente entre as duas secções histológicas (imagens A e B). **C-D)** Detalhes dos resultados das reações imuno-histoquímicas em um menor aumento. **C)** com anti α - β GtH (cabeça de seta). **D)** com anti β GtH (cabeça de seta). Notar que existe um padrão de imunorreatividade diferente entre as duas secções histológicas (imagens C e D). **A,B:** Barra = 100 μ m. **C-D:** Barra = 50 μ m.

164

Figura 23: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações histoquímicas e imuno-histoquímicas. **A-G)** “*pars intermedia*” (PI), “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A)** Tricrômio de Mallory. **B)** Ácido Periódico de Schiff (PAS), os asteriscos indicam as reações PAS positivas nas células produtoras de gonadotropinas e somatolactina, respectivamente nas regiões PPD e PI; neuro-hipófise (NH). **C)** Resultado da reação imuno-histoquímica com α - β GtH de carpa. Anticorpo que mais reagiu com as células produtoras de gonadotropinas de tabarana. **D)** Resultado da reação imuno-histoquímica com β GtH de carpa. **E)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-salmon hormônio de crescimento (sGH). Observar a forte marcação do anticorpo de salmão nas células produtoras de hormônio de crescimento da tabarana na região PPD. **F)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-salmon somatolactina (sSL). Notar a forte marcação do anticorpo de salmão nas células produtoras de somatolactina da tabarana na região PI. **G)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-salmon prolactina (sPRL). Observar a forte marcação do anticorpo de salmão nas células produtoras de prolactina da tabarana apenas na região da RPD. **A-G:** Barra = 300 μ m.

165

Figura 24: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-H)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no cativeiro. Notar a variação da intensidade da imuno-reação e do número de células produtoras de GH marcadas ao longo do ciclo reprodutivo. **A,C,E,G)** “*pars intermedia*” (PI);

“rostral pars distalis” (RPD) e “proximal pars distalis” (PPD). **A)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas durante o estágio repouso. **B)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio repouso. **C)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de maturação inicial. **D)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maturação inicial. **E)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio maturação avançada. **F)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maturação avançada. **G)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de regressão/esgotado. **H)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio regressão/esgotado. **A,C,E,G:** Barra = 300µm. **B,D,F,H:** Barra = 20µm.

167

Figura 25: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-F)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no ambiente natural. Notar a variação da intensidade da imuno-reação e do número de células produtoras de GH marcadas ao longo do ciclo reprodutivo. **A,C,E)** “pars intermedia” (PI); “rostral pars distalis” (RPD) e “proximal pars distalis” (PPD). **A)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas durante o estágio repouso. **B)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio repouso. **C)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio maduro. **D)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maduro. **E)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de regressão/esgotado. **F)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio regressão/esgotado. **A,C,E:** Barra = 300µm. **B,D,F:** Barra = 20µm.

169

Figura 26: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-D)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no ambiente impactado por barragem. Notar a variação da intensidade da imuno-reação e do número de células

produtoras de GH marcadas ao longo do ciclo reprodutivo. **A,C)** “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio repouso. **B)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio repouso. **C)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio maduro. **D)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maduro. **A,C:** Barra = 300µm. **B,D:** Barra = 20µm.

170

Figura 27: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-H)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-somatolactina de salmão (sSL) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no cativeiro. Notar a variação da intensidade da imuno-reação e do número de células produtoras de SL marcadas ao longo do ciclo reprodutivo. **A,C,E,G)** “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas durante o estágio repouso. **B)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio repouso. **C)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de maturação inicial. **D)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maturação inicial. **E)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio maturação avançada. **F)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maturação avançada. **G)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de regressão/esgotado. **H)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio regressão/esgotado. **A,C,E,G:** Barra = 300µm. **B,D,F,H:** Barra = 20µm.

171

Figura 28: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-F)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-somatolactina de salmão (sGH) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no ambiente natural. Notar a variação da intensidade da imuno-reação e do número de células produtoras de SL marcadas ao longo do ciclo reprodutivo. **A,C,E)** “*pars intermedia*” (PI); “*rostral*

pars distalis” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio repouso. **B)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio repouso. **C)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio maduro. **D)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maduro. **E)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de regressão/esgotado. **F)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio regressão/esgotado. **A,C,E:** Barra = 300µm. **B,D,F:** Barra = 20µm.

173

Figura 29: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-D)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-somatolactina de salmão (sSL) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no ambiente impactado por barragem. Notar a variação da intensidade da imuno-reação e do número de células produtoras de SL marcadas ao longo do ciclo reprodutivo. **A,C)** “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio repouso. **B)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio repouso. **C)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio maduro. **D)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maduro. **A,C:** Barra = 300µm. **B,D:** Barra = 20µm.

174

Figura 30: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-H)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-prolactina de salmão (sPRL) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no cativeiro. Notar a variação da intensidade da imuno-reação e do número de células produtoras de PRL marcadas ao longo do ciclo reprodutivo. **A,C,E,G)** “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio repouso. **B)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio repouso. **C)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de maturação inicial. **D)** Detalhe das células imuno-reativas durante o

estádio maturação inicial. **E)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio maturação avançada. **F)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maturação avançada. **G)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de regressão/esgotado. **H)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio regressão/esgotado. **A,C,E,G:** Barra = 300µm. **B,D,F,H:** Barra = 20µm.

175

Figura 31: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-D)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-hormônio de salmão (sGH) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no cativeiro (grupo experimental 03). Região da “proximal pars distalis”. **A)** Imagem sem tratamento pelo programa *MATLAB*. Notar as reações imuno-histoquímica selecionadas para ser analisada (cabeça de seta). **B)** Resultado da análise realizada pelo programa *MATLAB*. Observar que este programa fornece uma imagem sem a coloração selecionada (marrom). As cabeças de seta ilustram as regiões, nas quais a coloração marrom foi contabilizada pelo programa. **C)** Aspecto geral da mesma imagem, indicando as campos que foram selecionados para analisar os núcleos das células não marcadas com o anticorpo anti-GH (cabeça de seta) para a análise relativa. **D)** Resultado da análise realizada pelo programa *MATLAB*. Observar que este programa contabiliza regiões que não foram selecionadas (cabeça de seta). **A-D:** Barra = 20µm.

177

Figura 32: *Salminus hilarii* – Concentração plasmática de estradiol em fêmeas, por estágio de maturação gonadal e por grupo experimental. ^{a,b} Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo estágio e ambientes diferentes; * Símbolos diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo ambiente e estádios diferentes.

178

Figura 33: *Salminus hilarii* – Concentração plasmática de testosterona em fêmeas, por estágio de maturação gonadal e por grupo experimental. ^{a,b} Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo estágio e ambientes diferentes; * Símbolos diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo ambiente e estádios diferentes.

178

Figura 34: *Salminus hilarii* – Concentração plasmática de 17 α -hidroxiprogesterona em fêmeas, por estágio de maturação gonadal e por grupo experimental. ^{a,b} Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo estágio e ambientes diferentes; * Símbolos diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo ambiente e estádios diferentes.

179

Lista de Anexos

Anexo 01: Protocolo de análises de histoquímica de gônadas (ovários e testículos) e hipófise.

181

Anexo 02: Protocolo de análises de imuno-histoquímica de hipófise.

185

Anexo 03: Protocolo de análises dos esteróides gonadais (17α -hidroxiprogesterona, estradiol e testosterona).

187

Resumo

A tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes) é uma espécie reofílica de grande importância ecológica na Bacia do Alto Tietê (São Paulo/SP, Brasil). Atualmente esta espécie sofre com a poluição (industrial e doméstica) e a construção de barragens na região, o que pode prejudicar o comportamento migratório reprodutivo das espécies reofílicas, bloqueando a reprodução. O presente estudo tem como objetivo analisar os mecanismos fisiológicos envolvidos no controle endógeno da reprodução *Salminus hilarii*, analisando-se o eixo hipófise-gônadas. Adicionalmente, buscou-se avaliar se o bloqueio da migração reprodutiva (parcial ou total) altera o funcionamento deste eixo. Os animais foram coletados no ambiente natural (Bacia do Alto Tietê), na saída da Barragem da Barragem de Ponte Nova e na Piscicultura de Ponte Nova (Salesópolis/SP) durante o período de abril de 2004 e agosto de 2006. As análises macro e microscópicas das gônadas e os valores de IGS mostraram que o período reprodutivo da tabarana ocorreu entre os meses de outubro a fevereiro. As análises macroscópicas e microscópicas dos ovários e dos testículos permitiram classificar o desenvolvimento ovariano em 4 estádios: repouso, maturação inicial, maturação avançada (cativeiro), maduro (ambiente natural) e regressão/esgotado e o desenvolvimento testicular em 3 estádio: repouso, maduro e regressão. O desenvolvimento oocitário da tabarana é do tipo sincrônico em grupo e a desova é total; os testículos são do tipo tubular anastomosado e espermatogonial irrestrito. Foram identificados 5 tipos celulares no interior dos ovários: oogônias, oócito perinucleolar, oócito cortical-alveolar, oócito vitelogênico e oócito maduro, além de estruturas derivadas desse desenvolvimento, os folículos pós-ovulatórios e os oócitos atrésicos. Identificou-se também 6 tipos celulares no interior dos testículos: espermatogônias, espermatócitos, espermatídes, espermatozóides, células de Sertoli e células de Leydig. A hipófise de *S. hilarii* é composta de dois tecidos: a adeno-hipófise (tecido glandular endócrino) e a neuro-hipófise (origem nervosa). Adicionalmente, foi verificado que a adeno-hipófise é subdividida em: “*rostral pars distalis*” (RPD), “*proximal pars distalis*” (PPD) e “*pars intermedia*” (PI). Seis tipos celulares foram identificados na adeno-hipófise: as células

produtoras de prolactina (PRL) e as células produtoras de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) foram identificadas na região da RPD; as células produtoras de hormônio de crescimento (GH) e as células produtoras de gonadotropinas (GtHs) estão situadas na região da PPD; as células produtoras de melanotropina (MSH) e as células produtoras de somatolactina (SL) estão presentes na PI. As células PRL não apresentam variações ao longo do ciclo reprodutivo da tabarana, no entanto, as células produtoras de GH diminuem a porcentagem de imunomarcagem com o avanço do ciclo reprodutivo. Já as células produtoras de SL aumentam a porcentagem de imunomarcagem com o desenvolvimento das gônadas. Adicionalmente, foi verificada a presença de duas gonadotropinas na região da adeno-hipófise, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Em relação ao perfil plasmático dos esteróides gonadais, foi verificado que o estradiol aumenta com o avanço do ciclo reprodutivo, diminuindo do estágio maduro para o estágio regressão/esgotado (ambiente natural). No cativeiro ocorreu um aumento da concentração de estradiol do estágio repouso até o estágio maturação média, diminuindo logo em seguida nos estádios maturação avançada e regressão/esgotado. A concentração de testosterona eleva-se com o avanço da maturação gonadal, atingindo os valores máximos no estágio maduro (ambiente natural) e maturação avançada (cativeiro). Paralelamente, o estradiol apresentou-se alto somente na maturação média (cativeiro) e maduro (ambiente natural), evidenciando uma relação entre esses dois hormônios. Valores mais elevados de 17α -hidroxiprogesterona no cativeiro sugerem uma deficiência na conversão deste esteróide para 17α , 20β -dihidroxy-4-pregnen-3-one, considerado como o hormônio indutor da maturação final e ovulação na maioria dos teleósteos. Os resultados encontrados evidenciam que o bloqueio da migração altera a fisiologia do eixo hipófise-gônadas em *Salminus hilarii*.

Abstract

The tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes) is a reofilic species of great ecological importance in the Region of the Alto Tietê Basin (São Paulo/SP, Brazil). This fish reaches greater sizes in this Basin and as a carnivorous species, which occupies the top of the alimentary chain. Nowadays, the Tietê Basin is affected by pollution (industrial and domestic) and dam constructions in the upper reaches of the river, hindering the reproductive migratory behavior of the reofilic species. When the “piracema” fish migration is obstructed, the reproduction fails, making evident, that the dam construction in the Brazilian rivers causes great impacts in the life cycle of the reofilic teleost. The aim of this study was analyze the physiological mechanisms involved in *Salminus hilarii* reproduction, analyzing the pituitary-gonads axis and additionally, to evaluate if the migration impediment (partial or total) modifies this axis physiology, and consequently the endogenous control of tabarana reproduction. From April 2004 to August.2006, the animals were collected in the natural environment (upper Tietê Basin), in the water exit of Ponte Nova Dam (Department of Water and Electric Energy) and in the Ponte Nova Dam Fishfarm (Salesópolis/SP). The microscopical analyses of the gonads and analyses of the gonadosomatic Index showed that the reproductive period of the tabarana occurred between October and February. The macroscopic and microscopical analyses of the ovaries and testis allowed to classify the ovarian development in 4 stages: resting, initial maturation, advanced maturation (captive) or maturity (natural environmental) and regression/spawned, and the testis development in 3 stages: resting, mature and regression. The tabarana oocyte development is group-synchronous and the spawning is total. The anastomosing tubular testis and unrestricted spermatogonia were observed. Five cellular types in the interior of the ovaries were identified: oogonia, perinucleolar oocyte, cortical alveolar oocyte, vitellogenic oocyte and ripe oocyte, and beyond structures derived from this development, the post-ovulatory follicles and the atretic oocyte. In the testis, 6 cellular types were identified: spermatogonia, spermatocytes, spermatids, spermatozoa, Sertoli cell and Leydig cell. *S. hilarii* pituitary is composed of two different tissues: adenohipophysis (endocrine tissue) and

neurohypophysis (nervous origin). Additionally, it was verified that adenohypophysis is subdivided in: “*rostral pars distalis*” (RPD), “*proximal pars distalis*” (PPD) and “*pars intermedia*” (PI). Six cellular types were identified in adenohypophysis: prolactin cells (PRL) and adenocorticotropin cells (ACTH) have been identified in the RPD region; growth hormone cells (GH) and the gonadotropins cells (GtHs) were situated in the PPD region; melanotropin cells (MSH) and somatolactin cells (SL) were present in the PI. PRL cells did not present variations throughout the reproductive cycle of the tabarana. However, the GH reaction showed a decrease in the cells stained percentage with the advance of the reproductive cycle. Also the SL cells increased the stained percentage along the gonads development. Additionally, the presence of two gonadotropins in the region of adenohypophysis, the follicle-stimulating hormone (FSH) and the luteinizing hormone (LH) was identified. The plasma levels of sex steroids showed that estradiol increased with the advance of the reproductive cycle, diminishing from the mature to the regression/spawning stage (natural environmental). In captivity an increase of the estradiol concentration from the resting to the medium maturation stage was observed, diminishing immediately afterwards in advanced maturation and regression/spawning stage. The testosterone concentration increased with the advance of the gonadal maturation, reaching the maximum values in the mature stage (natural environmental) and advanced maturation stage (captivity). On the other hand, estradiol was high only in the medium maturation (captivity) and ripe stage (natural environmental), evidencing an interdependence between these two steroids. The progestagene analyses showed that, in all maturation stages, 17α OHP levels were higher in captivity than in the natural environment, suggesting that the conversion of this steroid to $17\alpha 20\beta$ DHP (MIS) is affected in impaired environments, and that the conversion enzyme (20β desidrogenase) fails when migration is blocked. The results allow to conclude that the migration impairment change negatively the pituitary-gonads axis in *S. hilarii*.

1 – Introdução

A aquicultura mundial demonstra-se como uma fonte alternativa de produção de alimento devido ao crescimento populacional descontrolado, obrigando o homem a procurar recursos alimentares alternativos para sanar os problemas relacionados à fome (FAO, 2006). Em 2004, a produção total da aquicultura, incluindo peixes, crustáceos e plantas aquáticas foi estimada em 30 milhões de toneladas, sendo que, 51% dessa produção total é representada pela maricultura, 43% pela produção dulciaquícola e 6% são representados pela produção estuarina (FAO, 2006). Levando em consideração toda essa produção mundial, o principal grupo utilizado na aquicultura é formado pelos peixes. Ainda que, portador do maior número de espécies ícticas do mundo, a produção aquícola brasileira está baseada principalmente no cultivo de espécies exóticas, como por exemplo, carpas, tilápias e trutas, sendo as espécies nativas produzidas em menor escala (Borghetti *et al.*, 2003; FAO, 2006).

Os peixes em geral são os representantes mais numerosos e diversos entre os vertebrados, contando com aproximadamente 50% deste grupo (Nelson, 1994; Moyle & Cech, 2003). São conhecidas cerca de 28000 espécies viventes de peixes que ocupam os mais diversos ambientes aquáticos, ocorrendo desde as altas altitudes até as fossas submarinas dos oceanos. Em relação à sua distribuição, 58% são marinhos, 41% são dulciaquícolas e 1% vivem entre esses dois ambientes, ou seja, essas espécies realizam migrações entre o ambiente marinho e o ambiente de água doce (Wootton, 1990). Além da importância como fonte alternativa de alimento, os peixes também constituem uma rica fonte de material biológico que podem ser utilizados como modelos para entender os controles dos processos biológicos (Blázquez *et al.*, 1998).

Essa grande diversidade da ictiofauna existente no mundo vem despertando interesse de várias pessoas e de vários ramos de atividade, não só da comunidade científica, mas também de empresas ligadas à piscicultura, turismo (pesca esportiva), entre outras atividades.

Desta maneira, com esse grande número de espécies existentes, a constantes descobertas de novas espécies e a distribuição mundial, esse

sucesso do grupo é atribuído a uma série de adaptações fisiológicas, anatômicas, morfológicas, comportamentais entre outras características relacionadas aos processos de respiração, nutrição, osmorregulação, flutuação, percepção sensorial e reprodução (Hoar, 1969; Wootton, 1990; Moyle & Cech, 2003; Zavala-Camin, 2004). Em relação à reprodução, os peixes são ótimos exemplos da complexidade reprodutiva, com as diferentes formas anatômicas observados nas gônadas entre as espécies; as diferentes formas de liberação dos gametas para a fertilização externa (como por exemplo, a desova total ou a desova parcelada); desenvolvimento de diferentes órgãos especializados para a fertilização interna (gonopódio, por exemplo); as diferentes formas de cuidado com a prole (guardadores e não guardadores de ovos e larvas); além das diferentes formas de construções de ninhos e a migração reprodutiva, seja nas formas de “piracema” ou naquelas longas migrações entre os mares e os rios e vice-versa, que são acompanhadas por grandes alterações osmóticas e metabólicas (Wootton, 1990; Vazzoler, 1996; Lowe-McConnell, 1999; Hochachka, & Somero, 2002; Moyle & Cech, 2003; Zavala-Camin, 2004).

Além da produção de alimentos, a aquicultura brasileira possui grande importância na preservação das espécies ameaçadas de extinção, devido ao cultivo dessas espécies em cativeiro e posteriormente, na instalação de programas de repovoamento em áreas impactadas. Ao analisar a Lista Nacional das Espécies de Animais Ameaçadas de Extinção (Brasil, 2004), pode-se constatar a presença de várias espécies de peixes em situações críticas, sendo que uma inversão nesse quadro só é possível com base em programas adequados de repovoamento, que só podem atingir algum sucesso quando as técnicas de reprodução e produção são dominadas. Adicionalmente, sabe-se que o sucesso no cultivo de uma espécie só é obtido com o conhecimento da biologia dessa espécie e, em especial da biologia reprodutiva.

Ainda em relação à biologia de uma espécie, segundo Dias (1989), para a preservação de uma espécie são importantes três atributos básicos: a alimentação, o crescimento e a reprodução. Excetuando-se a energia utilizada para a manutenção do organismo, o restante da energia obtida é transferida, armazenada e consumida, ora para o crescimento, ora para a reprodução e ora para a obtenção de alimento. Dentre esses três atributos, somente a

reprodução não atua apenas em nível individual (como a alimentação e o crescimento), pois, ela é imprescindível para que as espécies se perpetuem e transmitam as mudanças ocorridas no seu genoma para as seguintes gerações (Vazzoler, 1996).

No Brasil, grande parte dos peixes dulciaquícolas de valor comercial são representadas pelas espécies migradoras (reofilicas), 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 (corredeiras e cachoeiras), para se reproduzir (Vazzoler & Menezes, 1992; Lucas & Baras, 2001). A migração é necessária para o desenvolvimento das gônadas (ovários e testículos), maturação dos gametas e posterior desova (Agostinho *et al.*, 2003), e o sucesso reprodutivo em espécies migradoras fica prejudicado quando estes animais são impedidos de migrar. Esse problema ocorre frequentemente, em decorrência de bloqueios no percurso natural dos rios (reservatórios) ou no confinamento em viveiros de cultivo.

A reprodução em peixes, apesar de ser modulada por fatores ambientais, como por exemplo, a temperatura, o fotoperíodo nas espécies de clima temperado e possivelmente a temperatura e as chuvas nas espécies de clima tropical, é controlada endogenamente por um sistema endócrino, principalmente pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, que sintetiza e libera gonadotropinas, esteróides gonadais e hormônios moduladores do processo reprodutivo entre outras substâncias (Weltzien *et al.*, 2004; Takei & Loretz, 2006; Agulleiro *et al.*, 2006; Kawauchi & Sower, 2006). Esse processo ocorre naturalmente com o desenvolvimento das gônadas, maturação, liberação e fertilização dos gametas, sendo que em geral, em peixes, a desova e a fertilização ocorrem no ambiente externo (West, 1990; Tyler & Sumpter, 1996; Rocha & Rocha, 2006). Os ovos fertilizados originam embriões e posteriormente larvas, que crescem e se tornam adultos, reiniciando o ciclo.

Os processos endógenos citados acima podem ser modulados de acordo com a estratégia reprodutiva selecionada, em relação à periodicidade na eliminação dos gametas e na quantidade e tamanho dos mesmos. Neste sentido, a qualidade dos ovos e das larvas está relacionada com a qualidade das reservas nutricionais disponível nos oócitos em desenvolvimento. Essas reservas oocitárias (vitelo) são mobilizadas a partir dos lipídios e proteínas

armazenados em diversos tecidos, como o fígado, tecido adiposo e músculo (Moreira *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2002), e a composição do alimento ingerido também é de grande importância no desenvolvimento das gônadas (principalmente nos ovários), o que leva a supor que a alteração da cadeia trófica certamente influenciará a qualidade e/ou quantidade de vitelo armazenado.

Neste contexto, todo o controle endócrino deve ser alterado de alguma forma, quando espécies migradoras são transferidas para o cativeiro, em operações de cultivo, pois, neste ambiente confinado, os peixes reofílicos (peixes de piracema) não conseguem eliminar os seus gametas de forma natural. Neste caso, intervenções hormonais exógenas em determinados níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas são necessárias para dar continuidade ao processo de maturação gonadal (Zohar & Mylonas, 2001). Assim, demonstra-se a importância de estudar o controle fisiológico do eixo-hipotálamo-hipófise-gônadas nas espécies nativas, ainda pouco investigadas.

1.1 – Revisão bibliográfica

1.1.1 – Fisiologia da reprodução em peixes (eixo hipotálamo-hipófise-gônadas)

Em geral, a fisiologia da reprodução em peixes pode ser sintetizada da seguinte forma (Nagahama, 1994; Peter & Yu, 1997; Blázquez *et al.*, 1998; Weltzien *et al.*, 2004): a partir do momento em que a idade e o peso mínimo são atingidos para o início da reprodução, alterações ambientais como o fotoperíodo, a temperatura e, possivelmente as chuvas, são captadas através dos olhos, pineal, narinas e receptores cutâneos, que as convertem em sinais eletroquímicos e, são transmitidos via neurônios sensoriais até o hipotálamo. Os fatores ambientais citados estimulam o hipotálamo a sintetizar e liberar o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), que estimula as células gonadotróficas na hipófise a sintetizar e liberar o hormônio folículo estimulante (FSH), que via corrente sanguínea chega às camadas foliculares dos oócitos em desenvolvimento e na camada teca, converte o colesterol em testosterona.

Esta é transportada à camada granulosa, na qual é aromatizada a 17β -estradiol pela enzima aromatase, também sob influência do FSH. O 17β -estradiol age no fígado (via corrente sangüínea), estimulando a síntese da glicolipofosfoproteína (vitelogenina) que, também via corrente sangüínea, é “seqüestrada” pelo oócito por micropinocitose (processo dependente de FSH), promovendo o crescimento do oócito e incorporação de vitelo.

A detecção da vitelogenina, como precursora do vitelo protéico tem sido intensamente pesquisada nas últimas décadas, desde a síntese do 17β -estradiol como produto de ação no fígado até estudos com enfoques ambientais, como por exemplo, os disruptores endócrinos que são compostos que podem afetar o sistema endócrino e assim toda a fisiologia reprodutiva (Goksøyr *et al.*, 2003). Os machos de teleósteos também possuem o gene para vitelogenina, entretanto, o mesmo não é expresso devido ao baixo nível de estradiol circulante, podendo ser expresso em raras situações, como por exemplo, na exposição dos indivíduos a poluentes com ação estrogênica (Moncaut *et al.*, 2003).

É importante salientar que a detecção da vitelogenina no muco dos peixes tem sido sugerida como forma de diferenciação do sexo, pois na maioria dos peixes não ocorre um dimorfismo sexual e, além disso, a detecção da vitelogenina pode ser utilizada como forma de seleção para saber o estado de maturidade dos peixes (Moncaut *et al.*, 2003).

Na fase de vitelogênese, que é um processo pelo qual o citoplasma do oócito acumula substâncias de reservas para posterior utilização pela larva, ocorre um aumento nos níveis plasmáticos de 17β -estradiol e testosterona e esse aumento inibe a síntese de FSH (*feed back negativo*) e juntamente com a ação do GnRH estimulam a secreção hipofisária do hormônio luteinizante (LH) nas fases finais dessa vitelogênese. O LH estimula a camada teca do folículo a produzir 17α -hidroxiprogesterona, que é transportada à camada granulosa e convertida a $17\alpha,20\beta$ -dihidroxy-4-pregnen-3-one ou $17\alpha,20\beta$ -21-trihidroxy-4-pregnen-3-one pela enzima 20α -hidroxiesteróide-desidrogenase, dependendo da espécie considerada (Nagahama, 1994; Nagahama, 1999; Peter & Yu, 1997; Blázquez *et al.*, 1998). O hormônio 17α - 20β -dihidroxy-4-pregnen-3-one é

conhecido como o hormônio indutor da maturação final e da ovulação (MIS) na maioria dos peixes (Zohar & Mylonas, 2001; Pang & Ge, 2002).

Nos machos, o controle da síntese de esteróides é semelhante ao das fêmeas. FSH e LH estimulam a esteroidogênese testicular e espermatogênese, sendo os andrógenos, testosterona e 11-cetotestosterona produzidos pelas células de Leydig no tecido intersticial dos testículos, sendo, esses hormônios gonadais os mais importantes no desenvolvimento do testículo e das características sexuais secundárias nos machos (Grier, 1993; Cyr & Eales, 1996; Nagahama, 2000; Haider, 2004; Garcia-López *et al.*, 2006).

Para melhor compreensão do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, a seguir, cada parte deste eixo é considerada separadamente, no que concerne aos aspectos principais da fisiologia reprodutiva em peixes teleósteos, com ênfase nas espécies neotropicais.

1.1.2 – Hipotálamo, hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH)

O hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) é um neuropeptídeo hipotalâmico essencial na cascata de hormônios que coordena a fisiologia reprodutiva em todos os vertebrados, estimulando a produção de gonadotropinas (GtH) pela adeno-hipófise (Weltzien *et al.*, 2004; Guilgur *et al.*, 2006).

O GnRH é sintetizado em áreas específicas do encéfalo e estimula a produção de GtH na hipófise, que em teleósteo, ao contrário dos mamíferos, ocorre via inervação direta das células gonadotrópicas (Lethimonier *et al.*, 2004; Guilgur *et al.*, 2006). Assim, o GnRH estimula a produção e liberação de GtHs (hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante) e, estas GtHs são liberadas na corrente sangüínea e chegam até as gônadas, onde regulam a esteroidogênese e gametogênese (Gorbman & Sower, 2003).

Múltiplas formas de GnRH tem sido identificada em espécies representativas de todas as classes de vertebrados (Weltzien *et al.*, 2004). Segundo Guilgur *et al.*, (2006), são caracterizadas 24 diferentes formas moleculares de GnRH em várias espécies de vertebrados e invertebrados (14

formas em vertebrados e 10 formas em invertebrados), entretanto, todas as formas são decapeptídeos, exceto em *Octopus vulgaris* (Iwakoshi *et al.*, 2002) que possui doze aminoácidos e, além disso, os aminoácidos número 01, 04, 09 e 10 são perfeitamente conservados ao longo da evolução. É importante salientar, que as diferentes formas de GnRH são comumente conhecidas pelo nome da espécie em que foi primeiramente isolada (Weltzien *et al.*, 2004; Guilgur *et al.*, 2006; Tsai, 2006).

Neste contexto, em várias espécies de vertebrados foram descritas múltiplas formas de GnRH, sendo que, para todas as espécies de peixes foram encontradas as formas de cGnRH (*chicken II*), sGnRH (*salmon*) e uma terceira forma que pode ser considerada específica (Weltzien *et al.*, 2004; Guilgur *et al.*, 2006). Em geral para Characiformes a terceira forma de GnRH encontrada foi o sbGnRH (*seabream*) (Powell *et al.*, 1997), para Cyprinodontiformes o pjGnRH (peixe rei) (Somoza *et al.*, 2002), para Siluriformes o ctGnRH (*catfish*) (Dubois *et al.*, 2002), entre outras formas (Lethimonier *et al.*, 2004; Guilgur *et al.*, 2006). Além disso, em peixes teleosteos, essas variações de GnRH também apresentam distribuição neuro-anatômica diferenciada, como por exemplo, o sGnRH é expresso por neurônios do gânglio nervoso terminal, o cGnRH II pelos neurônios localizados no tegumento do mesencéfalo (“*midbrain*”) e a terceira forma é expresso principalmente pelos neurônios pré-óptico (Guilgur *et al.*, 2006). Em relação às espécies nacionais Powell *et al.*, (1997), identificaram três formas de GnRH em *Piaractus mesopotamicus* e Somoza *et al.*, (1994) sugeriram três formas de GnRH em *Prochilodus lineatus*, únicas espécies investigadas até o momento.

1.1.3 – Hipófise, células produtoras de gonadotropinas (GtHs)

A hipófise em peixes é dividida em duas regiões distintas: a adeno-hipófise (glandular) e a neuro-hipófise, identificadas de acordo com os diferentes tipos celulares. A neuro-hipófise se origina do assoalho do diencéfalo e constitui a porção nervosa da hipófise e a adeno-hipófise se origina do ectoderma do teto da cavidade oral primitiva (Junqueira & Carneiro, 2004; Weltzien *et al.*, 2004). Na região da neuro-hipófise, são encontradas as

terminações axonais dos neurônios hipotalâmicos, sendo que, em geral, nos teleósteos nessa região são liberados os neuro-hormônios, como por exemplo, a arginina – vasotocina (AVT), a isotocina (IST) e o hormônio concentrador de melanina (MCH), entre outros neuropeptídeos (Acher, 1996; Batten *et al.*, 1999; Duarte *et al.*, 2001; Weltzien *et al.*, 2004; Kawauchi, 2006). Apesar da neuro-hipófise estar diretamente relacionada com a reprodução, os estudos sobre o controle neuroendócrino das funções hipofisárias em teleósteos requerem o conhecimento da morfologia da hipófise, inervação dessa hipófise e a identificação e localização dos diferentes tipos celulares encontradas na região da adeno-hipófise (Weltzien *et al.*, 2004).

Em geral, a adeno-hipófise em peixes é subdividida em três regiões distintas, no que diz respeito ao arranjo e localização topográfica das células, características tintoriais dessas células e distribuição dos ramos da neuro-hipófise (Laiz-Carrión *et al.*, 2003; Cala *et al.*, 2003; Weltzien *et al.*, 2004; Kawauchi & Sower, 2006; Cinquetti & Dramis, 2006). Essas regiões são denominadas de: “*pars intermedia*” (PI), “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). Na PI encontram-se as células produtoras de melanotropina (MSH) e as células produtoras de somatolactina (SL); na PPD localizam-se as células produtoras de gonadotropinas (GtHs), comumente chamadas de FSH (hormônio folículo estimulante) e de LH (folículo luteinizante). As células produtoras de tireotropina (TSH) e as células produtoras de hormônio de crescimento (GH), conhecidas como células somatotrópicas, também são identificadas na região PPD. Já a RPD contém as células produtoras de prolactina (PRL) e as células produtoras de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH).

Devido à sua importância no controle da reprodução em peixes, as gonadotropinas (FSH e LH), têm sido objeto de estudo de vários pesquisadores. As GtHs são responsáveis pela estimulação das células foliculares nos ovários e das células de Leydig nos testículos, na síntese dos andrógenos, progestágenos e estrógenos como comentado anteriormente (Weltzien *et al.*, 2004; Kawauchi & Sower, 2006) e conseqüentemente na vitelogênese, indução da maturação final e na ovulação e liberação dos gametas (Zohar & Mylonas, 2001).

É importante salientar que as células gonadotrópicas possuem variações de número, tamanho, intensidade de grânulos e de vacuolização durante o ciclo reprodutivo (Weltzien *et al.*, 2004; Kawauchi & Sower, 2006; Pandolfi *et al.*, 2006). O método mais adequado para identificar as células gonadotrópicas é a reação de imuno-histoquímica. Este método utiliza anticorpos específicos para cada tipo de imunorreação, entretanto, ao utilizar anticorpos de mamíferos para GtHs em peixes, observa-se uma marcação, em menor intensidade, nas células TSH. Esta reação cruzada ocorre devido à similaridade estrutural das moléculas dos hormônios gonadotrópicos e tireotrópicos, pois, essas moléculas constituem-se de duas subunidades, α e β (Yaron *et al.*, 2001; Ayala *et al.*, 2003). A subunidade α é comum aos três hormônios (FSH, LH e TSH) e a subunidade β varia, sendo responsável pela atividade biológica do hormônio (Weltzien *et al.*, 2004; Kawauchi & Sower, 2006; Pandolfi *et al.*, 2006).

A presença de duas gonadotropinas foi identificada em várias espécies de peixes (Weltzien *et al.*, 2004; Kawauchi & Sower, 2006; Pandolfi *et al.*, 2006), no entanto, no “catfish” africano foi observada apenas uma GtH (Koide *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1995; Agulleiro *et al.*, 2006), assim como foi encontrado apenas uma GtH na lampréia (Agnata – Petromyzontiformes) (Sower *et al.*, 2006).

Nos salmonídeos o padrão de distribuição das células gonadotrópicas na hipófise é diferente nos estádios do ciclo reprodutivo (Nozaki *et al.*, 1990a; Nozaki *et al.*, 1990b; Naito *et al.*, 1991). Esses autores observaram que o número das células produtoras de FSH é significativamente maior que as células produtoras de LH durante os primeiros estágios da espermatogênese e vitelogênese, já nos animais maduros, o número de células produtoras de LH excede o de células produtoras de FSH.

Atualmente, para a identificação de FSH e LH em peixes, utilizam-se anticorpos altamente purificados de carpa, *catfish* e de salmão (β -FSH e β -LH), mostrando-se bem eficientes na marcação dessas células. Em relação às espécies nacionais, trabalhos que identificaram as células produtoras de FSH e de LH ainda são esparsos, sendo, identificadas em *Pimelodus maculatus* (Nóbrega *et al.*, 2006; Nóbrega, 2006), *Synbranchus marmoratus* (Antoneli, 2006), *Serrasalmus spilopleura* (Nóbrega, 2006), *Arapaima gigas* (Borella *et al.*,

2003a), *Osteoglossum bicirrhosum* (Borella *et al.*, 2003b), *Pseudoplatystoma fasciatum* (Beolchi *et al.*, 2003), *Prochilodus scrofa* (Parreira & Borella, 1996; Parreira, 1998) e *Piaractus mesopotamicus* (Borella *et al.*, 1997).

1.1.4 – Gônadas, caracterização ovariana e testicular

Em geral, os ovários e os testículos dos teleósteos são estruturas pares, alongadas, com as extremidades anteriores terminando em fundo cego e as extremidades posteriores unidas através de um ducto que alcança o poro genital para eliminar os gametas para o meio externo (King, 1995; Vazzoler, 1996; Wooton, 1990). Os ovários apresentam uma forma bifida e alongada, sendo que a coloração, o tamanho e a vascularização variam de acordo com o estágio de desenvolvimento ovariano e entre as espécies de peixes teleósteos. Os testículos são órgãos bem menores que os ovários, tubulares e alongados, que ao longo do desenvolvimento se tornam lobulados e esbranquiçados. Em alguns grupos taxonômicos é possível observar que os testículos apresentam “franjas” (Siluriformes, por exemplo), ou seja, os testículos também apresentam variações macroscópicas entre as espécies de peixes (Batlouni, 2004). Além disso, o hermafroditismo e a reversão sexual (hermafroditismo simultâneo, protoginia ou protandria) também são observados, mas em menor frequência em teleósteos, com maior destaque em espécies das famílias Serranidae, Labridae, Pomacentridae, Synbranchidae entre outras (Lo Nostro *et al.*, 2004; Zavala-Camin, 2004; Antoneli, 2006). Nesses grupos também são observadas diferenças macroscópicas nas gônadas.

Neste contexto, levando-se em consideração a biodiversidade no grupo dos teleósteos (cerca de 28000 espécies viventes) e a presença das mais variadas estratégias reprodutivas, como supracitado, recentemente, para as espécies nacionais tem sido adotado um critério para identificar os estádios de desenvolvimento testicular e, conseqüentemente, para identificar o ciclo reprodutivo em machos de peixes teleósteos, que é baseado nas espécies de clima temperado (Grier, 1993; Grier & Lo Nostro, 2000; Brown-Peterson *et al.*, 2002; Parenti & Grier, 2004).

Os testículos apresentam diferenças morfológicas ao longo da evolução nos vertebrados (Grier, 1993), entretanto compartilham uma gama de características em comum, como por exemplo: A) são responsáveis pela formação dos espermatozóides (espermatogênese); B) são responsáveis também pela síntese dos esteróides gonadais (esteroidogênese), sendo que, esses esteróides participam no desenvolvimento gonadal, além de atuar no desenvolvimento das características sexuais secundárias, primeira maturação gonadal dos indivíduos imaturos e desenvolvimento (maturação) dos testículos nos animais adultos; C) são divididos em dois compartimentos, o compartimento germinativo e o compartimento intersticial, sendo estes compartimentos separados por uma membrana basal; D) o compartimento germinativo é constituído por dois componentes: as células germinativas que originarão os espermatozóides e as células somáticas, que são conhecidas como as células de Sertoli, cujas funções principais são nutrição, suporte e fagocitose (Grier *et al.*, 1980; Grier, 1993; Grier & Taylor, 1998; Grier & Lo Nostro, 2000; Brown-Peterson *et al.*, 2002; Parenti & Grier, 2004; Nóbrega, 2006). É importante destacar que, em todos os vertebrados, o epitélio germinativo é composto por dois tipos celulares distintos, as células somáticas e as células germinativas, acrescido da membrana basal, sendo, definido como uma estrutura tripla (Grier, 1993). Na ausência de algum desses componentes, o tecido não é considerado um epitélio germinativo (Grier, 1993).

Apesar das características anteriormente apresentadas serem altamente conservadas ao longo da evolução, é possível identificar dois tipos de organização testicular nos vertebrados. Essa organização é realizada com base nas variações morfológicas que ocorrem no compartimento germinativo durante o ciclo reprodutivo (Grier, 1993; Grier & Lo Nostro, 2000; Brown-Peterson *et al.*, 2002): o primeiro tipo ocorre nos amniotas (répteis, aves e mamíferos) e o segundo tipo ocorre nos anamniotas (agnatas, condricties, osteicties e anfíbios) (Grier *et al.*, 1980; Grier, 1993).

Nos amniotas, o compartimento germinativo é formado por túbulo, que não terminam na periferia testicular e, cujas extremidades estão conectadas a um sistema de ductos (*rete testis*). Nestes túbulos, uma população residente de células de Sertoli está conectada a uma população de células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento (Grier, 1993).

Nos anamniotas a espermatogênese ocorre no interior de estruturas conhecidas como espermatocisto, ou simplesmente chamado de cistos (Grier, 1993; Pudney, 1995). As diferenças observadas entre os anamniotas são: em agnatas e condricties, o cisto é uma estrutura esférica formada pela membrana basal que envolve uma população de células de Sertoli e células germinativas. A diferença entre os dois grupos, é que em agnatas, quando os cistos se abrem, os espermatozóides são liberados na cavidade corpórea, pois neste grupo o sistema de ductos testiculares está ausente, já em condricties cada espermatocisto está conectado a um sistema de ductos e, portanto, não são liberados na cavidade corpórea como em agnatas. Em relação aos osteicties e anfíbios, o epitélio germinativo está localizado dentro de estruturas alongadas, conhecidas como lóbulos ou túbulos, nas quais, os cistos estão em contato com a membrana basal (que delimita uma estrutura lobular ou tubular), diferentemente dos agnatas e condricties, nos quais os cistos são estruturas esféricas, ou seja, os espermatocistos de agnatas e condricties estão completamente envolvidos pela membrana basal (Grier, 1993).

Neste contexto, para as espécies nacionais esse critério de identificação do desenvolvimento testicular vem cada vez mais sendo utilizado para descrever o ciclo reprodutivo em machos de teleósteos, como se constata nos trabalhos de Veríssimo-Silveira, (2003); Batlouni *et al.*, (2006), Nóbrega (2006), Veríssimo-Silveira *et al.*, (2006); Nóbrega & Quagio-Grassiotto, (2007), dentre outros.

Levando em consideração o desenvolvimento ovariano, uma característica comumente observada é o tipo de desenvolvimento oocitário, ou seja, o tipo de desova que as fêmeas apresentam. Em geral, observam-se quatro padrões básicos de desenvolvimento oocitário em peixes: sincrônico, sincrônico em grupo, sincrônico em grupo com múltiplas desovas e assincrônico (West, 1990; Tyler & Sumpter, 1996; Rocha & Rocha, 2006). O padrão sincrônico é representado por fêmeas que possuem um desenvolvimento oocitário bem definido, no qual todos os oócitos amadurecem ao mesmo tempo, e normalmente os peixes morrem depois da primeira e única desova, como por exemplo, os salmões migratórios do Pacífico (por exemplo: *Oncorhynchus keta*), que migram dos oceanos em direção aos rios para a reprodução, períodos em que são observadas grandes alterações osmóticas e

metabólicas nesses animais. Além desses salmões do Pacífico, as lampréias (família Petromyzontidae) e a enguia de água doce (*Anguilla anguilla*), também apresentam este tipo de desova (Zohar & Mylonas, 2001).

O tipo sincrônico em grupo ocorre em fêmeas representadas por peixes de desova total durante um ciclo reprodutivo que normalmente é anual. Assim, no interior dos ovários são observados pelo menos dois grupos de tamanho diferentes de oócitos, sendo que, o grupo maior é o mais homogêneo e possuem os oócitos maiores, que serão liberados no ciclo reprodutivo atual, já o grupo menor, normalmente composto por oócitos de menor diâmetro, serão recrutados na próxima desova. A maioria da fauna íctica (dulciaquícola) tropical é representada por esse último tipo de desenvolvimento oocitário, como por exemplo, *Colossoma macropomum* (Venturieri, 1997), *Piaractus mesopotamicus* (Lima *et al.*, 1991), *Salminus brasiliensis* (Lima, 1986; Weingartner & Zaniboni-Filho, 2005), *Brycon cephalus* (Romagosa *et al.*, 2002) entre outras espécies. As fêmeas nas quais se observa o tipo sincrônico em grupo com múltiplas desovas, são representadas por espécies que apresentam um desenvolvimento sincrônico e normalmente o ciclo reprodutivo é anual, entretanto, durante este período reprodutivo, são observadas múltiplas desovas dentro de um único ciclo reprodutivo (Rocha & Rocha, 2006).

O desenvolvimento oocitário assincrônico ocorre em peixes com desova parcelada, representados pela maioria das espécies marinhas, como por exemplo, a corvina (*Micropogonias furnieri*) (Carneiro *et al.*, 2005; Haimovici & Ignácio, 2005) e a sardinha (*Sardinella brasiliensis*) (Cergole & Rossi-Wongtschowski, 2005) entre outras espécies marinhas (Vazzoler, 1996). Entretanto existem peixes tropicais que habitam água doce com esse padrão de desenvolvimento como, por exemplo, o pirarucu (*Arapaima gigas*) (Godinho *et al.*, 2005), a traíra (*Hoplias malabaricus*) (Vieira & Lopes, 2005) e o tucunaré (*Cichla ocellaris*) (Gomiero & Braga, 2004) dentre as espécies nativas.

Além da importância na produção de gametas, os ovários e os testículos são importantes também na produção dos esteróides gonadais, como citado anteriormente. A produção de esteróides gonadais em várias espécies de peixes de clima temperado tem sido estudada (Yaron & Sivan, 2006), mas poucas espécies nativas foram investigadas, sendo estes estudos restritos à: *Piaractus mesopotamicus* (Gazola *et al.*, 1996; Gazola & Borella,

1997; Iseki, 2002), *Colossoma macropomum* (Venturieri, 1997), *Salminus brasiliensis* (Moreira, 1999), *Rhamdia quelen* (Barcellos *et al.*, 2001) e *Synbranchus marmoratus* (Antoneli, 2006).

De uma forma geral, apesar do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas ser responsável pelo controle endócrino da reprodução em peixes, como visto anteriormente, o conhecimento da fisiologia deste eixo para as espécies nativas ainda é bastante escasso. Os mecanismos fisiológicos que levam ao bloqueio da reprodução em peixes reofílicos (peixes de piracema) quando estes são impedidos de migrar, por exemplo, quando ocorre à construção de barragens ou quando são transferidos para o cativeiro em operações de cultivo, ainda não são bem compreendidos. Zohar & Mylonas, (2001) sintetizam três tipos de disfunção endócrina observadas em reprodutores de peixes migradores. O primeiro problema e o mais severo ocorre em enguias (*Anguilla anguilla*), nas quais a vitelogênese e a espermatogênese falham completamente quando os reprodutores são mantidos em cativeiro. A segunda disfunção é a ausência da maturação final nos oócitos e o último problema é a falha na desova ao final do ciclo reprodutivo. Para as espécies nacionais a disfunção que ocorre normalmente é a ausência da maturação final dos oócitos (migração da vesícula germinativa) e o seu motivo ainda não está claro.

Estudos mostram que, por exemplo, em *Morone saxatilis* o perfil plasmático de LH em fêmeas capturadas no ambiente natural é superior aquele encontrado nos animais em cativeiro (Mylonas *et al.*, 1997; Mylonas *et al.*, 1998). No entanto, o conteúdo de LH na hipófise e a expressão de seu RNAm não diferem entre estes dois grupos de animais, sugerindo que o insucesso na reprodução possa ser devido a problemas na liberação do LH da hipófise para a circulação sanguínea. Para as espécies nacionais, apenas em *Salminus hilarii* foi realizado estudos em relação à expressão de FSH e LH em animais de ambiente natural e cativeiro (Melo, 2006). Neste estudo, Melo (2006) observou que a expressão de FSH e LH em animais de cativeiro é menor em relação aos animais de ambiente de cativeiro.

Neste contexto, considerando-se que as espécies de peixes de piracema, quando são impedidas de migrar, apresentam um bloqueio na reprodução, fica evidente, que a construção de reservatórios nos rios brasileiros causa grandes impactos no ciclo de vida dos peixes reofílicos,

principalmente nos aspectos relacionados à fisiologia reprodutiva. Este bloqueio, como mencionado anteriormente, também é observado nas espécies de peixes de piracema quando transferidas para o cativeiro (piscicultura) em operações de cultivo.

Desta forma, os estudos sobre a disfunção endócrina de peixes em cativeiro, principalmente em relação ao eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, são escassos mesmo em espécies de clima temperado, e raros em teleósteos de clima tropical.

1.2 – Breve descrição da espécie e a importância de *Salminus hilarii*

A tabarana *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (figura 01a), pertence à classe Actinopterygii, Família Characidae (Ordem Characiformes), distribuindo-se nos rios das bacias do Alto Paraná, São Francisco e Tocantins, sendo encontrada também nos rios das bacias do Alto Amazonas e Alto Orinoco (Lima *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2007). A tabarana é uma espécie carnívora (piscívora), de porte médio, voraz, apresentando duas séries de dentes cônicos, pontiagudos e com as pontas voltadas para o interior da boca (Godoy, 1975). Possui coloração branca-prateada, nadadeira caudal vermelha, nadadeiras peitorais, pélvicas, dorsal e anal levemente tingidas de vermelho. *S. hilarii* é uma espécie migradora (peixe de piracema), ou seja, precisa durante um determinado período do ciclo reprodutivo, subir até as cabeceiras dos rios para a reprodução (Godoy, 1975). Essa migração é necessária para o desenvolvimento de suas gônadas, maturação e posteriormente a desova.

A escolha desta espécie como modelo biológico, deve-se ao fato da mesma apresentar estratégia reprodutiva do tipo sincrônico em grupo (Godoy, 1975), com as células oocitárias maturando concomitantemente, e eliminadas durante um curto período reprodutivo (Rocha & Rocha, 2006). Outro ponto determinante na escolha da espécie é a importância ecológica da mesma na Região do Alto Rio Tietê em São Paulo – Brasil.

O Rio Tietê nasce em Salesópolis/SP, aproximadamente a 95 km da Capital do Estado e a partir do município de Mogi das Cruzes/SP, devido à

poluição industrial e esgoto sem tratamento começa a apresentar problemas na qualidade de suas águas. Desta forma, desde a nascente em Salesópolis até a região de Mogi das Cruzes, pode-se dizer que o Rio Tietê apresenta apenas um pequeno trecho onde as espécies ícticas sobrevivem sem maiores problemas.

A tabarana já foi encontrada em abundância nos Rios Tietê e Pinheiros e em seus afluentes, em trechos da Capital, como relatado por von Ihering (1929) que comenta uma grande piracema de tabaranas no Rio Tamanduateí (afluente do Rio Tietê), em que um grande número de indivíduos invadiu a várzea do rio e centenas de quilos da espécie foram capturadas pelos pescadores. No entanto, atualmente a tabarana está reduzida a poucos cardumes, confinada em alguns quilômetros desse rio e seus tributários. Outro fato agravante é que a bacia do Alto Tietê apresenta atualmente muitos problemas, que podem colocar em risco a qualidade da água e a diversidade da fauna e flora. Entre os problemas mais evidentes para a ictiofauna estão a poluição e as barragens (reservatórios), sendo que estes últimos causam grandes problemas para as espécies reofílicas.

Apesar da indiscutível importância desses reservatórios, também é incontestável os problemas associados a estas interrupções no curso natural dos rios (Agostinho *et al.*, 1999). Os reservatórios são, por outro lado, recentes e suas comunidades mostram notáveis alterações estruturais em relação às que lhes deram origem, ou seja, as de um sistema fluvial com história evolutiva distinta (Agostinho *et al.*, 1999). Verifica-se durante o processo de colonização a depleção de algumas populações, para as quais novas condições são restritivas, e a explosão de outras, que têm no novo ambiente condições favoráveis, geralmente transitórias, para manifestar o seu potencial de proliferação (Agostinho & Gomes, 2005). Entre as espécies de peixes, a depleção populacional afeta principalmente as de maior porte, geralmente de hábito migratório, alta longevidade e baixo potencial reprodutivo. Já a proliferação massiva é constatada entre as espécies de pequeno porte, sedentárias, com alto potencial reprodutivo e baixa longevidade (r-estrategistas), para as quais a disponibilidade alimentar é elevada (Agostinho & Gomes, 2005).

Neste sentido quando esses peixes são impedidos de migrar, o sucesso reprodutivo fica prejudicado, podendo colocar em risco toda a diversidade de peixes da região da Bacia do Alto Rio Tietê. A tabarana é uma das espécies de maior porte na região, e sendo carnívora ocupa o topo da cadeia alimentar. Essa espécie é um típico exemplo de peixe que vem sofrendo com a poluição e a construção de barragens na região da Bacia do Alto Tietê, e que tem a sua migração alterada, prejudicando o ciclo reprodutivo.

Quanto à produção científica brasileira, utilizando-se *S. hilarii* como modelo biológico, poucos estudos até 2005 tinham sido realizados, contando-se apenas com o trabalho sobre aspectos gerais da migração da tabarana na Bacia do Rio Mogi Guaçu (Godoy, 1975), um relato de um capítulo de um livro sobre ovos e larvas (Nakatani *et al.*, 2001), comentários sobre aspectos reprodutivos na Bacia do São Francisco (Sato *et al.*, 2003) e aspectos de sistemática e taxonomia (Lima *et al.*, 2003).

Os estudos sobre *S. hilarii* eram esparsos e, essa situação da produção científica utilizando-se como modelo biológico a tabarana começou a se alterar a partir de 2005, quando *S. hilarii* passou a ser utilizada como objeto de estudos fisiológicos na Região da Bacia do Alto Tietê, relacionando-se ainda os aspectos ambientais dessa região. Um novo esforço de trabalho vem sendo dirigido a esta importante espécie, gerando conhecimento sobre a mesma e preenchendo esta lacuna no conhecimento desta importante espécie neotropical, como se constata nos trabalhos sobre perfil de esteróides gonadais (Amaral *et al.*, 2005; Amaral *et al.*, 2006), perfil metabólico (Rodrigues *et al.*, 2006; Camargo, 2007), fecundidade e diâmetro dos oócitos (Honji *et al.*, 2006d; Narcizo *et al.*, 2007), expressão do RNAm das células gonadotrópicas (Melo, 2006), caracterização histológica e imuno-histoquímica das células da adeno-hipófise (Honji *et al.*, 2006a), efeitos do bloqueio migratório no eixo hipófise – gônadas (Amaral *et al.*, 2007), caracterização do desenvolvimento oocitário (Honji *et al.*, 2006b) e a identificação das células produtoras de prolactina, hormônio de crescimento e somatolactina durante o ciclo reprodutivo (Honji *et al.*, 2007). Além desses estudos, encontra-se disponível na literatura brasileira uma abordagem geral da biologia reprodutiva (Andrade *et al.*, 2006; Takahashi, 2006; Takahashi *et al.*, 2007) e aspectos da sistemática e taxonomia (Lima *et al.*, 2007).

Os trabalhos citados para *S.hilarii* abordam temas gerais dentro da biologia básica da espécie, mas não focam os aspectos fisiológicos que são importantes para o entendimento da reprodução desta espécie ou ainda, os impactos que o bloqueio migratório total (cativeiro) ou parcial (reservatórios) podem trazer para o controle endócrino da reprodução nesses animais impedidos de realizar a piracema.

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi analisar os mecanismos fisiológicos envolvidos no controle endógeno da reprodução da tabarana *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Characiformes: Characidae), analisando-se o eixo hipófise-gônadas. Adicionalmente, buscou-se avaliar se o bloqueio da migração reprodutiva (parcial ou total) altera o funcionamento deste eixo e conseqüentemente o controle endógeno da reprodução da tabarana.

2.1.1 – Objetivos específicos

Para atingir este objetivo geral foram propostos os seguintes objetivos específicos:

1) Identificar as células adeno-hipofisárias da tabarana e verificar as possíveis alterações dessas células durante o ciclo reprodutivo e em situações de bloqueio migratório;

2) Analisar o efeito do bloqueio migratório no padrão de armazenamento de gonadotropinas nas células adeno-hipofisárias de *S. hilarii*;

3) Descrever as alterações do epitélio germinativo ovariano e testicular durante o ciclo reprodutivo de *S. hilarii* e verificar se os peixes privados de migração apresentam desenvolvimento completo dos gametas;

4) Quantificar os esteróides gonadais, testosterona, 17β -estradiol e 17α hidroxiprogesterona ao longo do ciclo reprodutivo da tabarana e o possível comprometimento das concentrações destes esteróides em peixes privados de migrar.

3 – Material e Método

3.1 – Material biológico (espécie estudada)

Segundo Lima *et al.*, (2003) e Lima *et al.*, (2007), *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (figura 01a) tem a sua posição sistemática apresentada abaixo:

Classe: Actinopterygii

Superordem: Ostariophysi

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Sub-família: Salmininae

Gênero: *Salminus* (Gênero *Incertae Sedis* em Characidae)

Espécie: *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850

Nome popular: tabarana, tubarana ou dourado branco

Alguns exemplares de *S. hilarii* foram depositados na coleção científica do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP).

3.2 – Captura do material biológico

O material biológico utilizado no presente estudo provém de capturas na região da Bacia do Alto Rio Tietê em três ambientes distintos: ambiente natural, ambiente impactado por barragem e em ambiente de cativeiro, os quais são sumarizados abaixo:

Grupo 01: peixes coletados em trechos de corredeiras (calha principal) de trechos do Rio Tietê, na Bacia do Alto Tietê e cabeceiras, entre as cidades de Mogi das Cruzes/SP e Biritiba Mirim/SP. As figuras 01b e 01c ilustram o

ponto de coleta de animais que não sofrem impacto por barragens (reservatórios) (23° 32' 45,3" S e 46° 08' 03,2" W).

Os exemplares deste grupo experimental foram capturados utilizando-se a pesca artesanal (vara e isca viva), sendo que, quando necessário fez parte inclusive do esforço de pesca a utilização de barco. Estas coletas foram realizadas entre os meses de abril de 2004 e outubro de 2005, levando-se em consideração o estágio do ciclo reprodutivo ao longo do ano. Entretanto é importante salientar que o número de animais, nas diferentes fases do ciclo reprodutivo, coletados ao longo desse ciclo não foi homogêneo, pois, existiu uma dependência na captura pelos pescadores e pelo regime pluviométrico.

Devido à falta de informação no que diz respeito à biologia da tabarana, principalmente em relação ao ciclo reprodutivo, utilizou-se como base de dados para as coletas dos exemplares em diferentes estádios do desenvolvimento gonadal, as informações disponíveis na literatura para outras espécies nativas, principalmente para as espécies da família Characidae (Venturieri, 1997; Moreira, 1999).

Grupo 02: peixes coletados na Bacia do Alto Tietê e cabeceiras, porém, na saída da Barragem de Ponte Nova (Salesópolis/SP), ou seja, imediatamente à jusante deste Reservatório. As figuras 01d e 01e ilustram o ponto de coleta de animais capturados em um ambiente impactado por barragens (bloqueio parcial da migração) (23° 34' 36,5" S e 45° 54' 23,9" W).

Neste local, os animais param de migrar devido à presença do Reservatório da Barragem de Ponte Nova (ambiente impactado). A arte de pesca utilizada neste local foi a pesca artesanal, com vara e isca viva, além da utilização de tarrafas. Estas coletas foram realizadas entre os meses de maio de 2004 e setembro de 2005. Neste grupo experimental a coleta também não foi de forma homogênea, pois, também existiu uma dependência na captura dos animais pelos pescadores, além do cronograma de fechamento e abertura das comportas do Reservatório de Ponte Nova.

Grupo 03: peixes coletados em viveiros da Piscicultura da Barragem de Ponte Nova, Salesópolis/SP (figuras 01f e 01g). Este grupo experimental ilustra o ponto de coleta de animais em que a migração reprodutiva foi bloqueada

totalmente (grupo de ambiente de cativeiro), ou seja, impedidos de migrar e conseqüentemente de se reproduzir (23° 35' 33,8" S e 45° 58' 09,1" W).

Os exemplares utilizados para compor o grupo de cativeiro (03), foram capturados no ambiente natural em 1998 e mantidos por sete anos em cativeiro. Durante este período, os exemplares não se reproduziram e, portanto constitui um grupo ideal para a investigação proposta no presente estudo. No primeiro semestre de 2005, vinte e quatro fêmeas de tabarana foram distribuídas em dois viveiros de 100 m² (figura 01g) na Piscicultura da Barragem de Ponte Nova (doze fêmeas por viveiro).

Durante o período experimental, os animais foram alimentados diariamente "*ad libitum*" com ração comercial extrusada, para carnívoros (Purina®), com teor de proteína bruta de 40% e granulometria de 15 mm. A ração foi oferecida a lanço, pois desta maneira possibilita uma maior dispersão e conseqüentemente uma maior utilização da mesma. A concentração de oxigênio dissolvido na água foi monitorada diariamente com um oxímetro (YSI – modelo 55) que registra também a temperatura da água. A coleta dos animais do grupo experimental 03 foi realizada entre os meses de setembro de 2005 e agosto de 2006. Além disso, quando necessário, os animais foram manejados com rede de arrasto e/ou tarrafa. Vale ressaltar também, que a alimentação dos exemplares no cativeiro foi suspensa somente um dia antes da captura dos peixes para a amostragem.

Levando-se em consideração as informações acima, no grupo experimental 03 foram realizadas cinco coletas ao longo deste período (2005 e 2006), tendo em vista as diferentes fases do ciclo reprodutivo da tabarana. No momento de cada coleta foram amostrados aleatoriamente dois animais em cada viveiro (quatro animais por estágio de desenvolvimento gonadal). Os meses de coleta dos animais foram: setembro e dezembro de 2005, abril, julho e agosto de 2006. Neste grupo experimental as coletas foram mais homogêneas, pois as amostragens no ambiente de cativeiro foram programadas com base nas informações disponíveis com o estudo prévio feito com os animais coletados no ambiente natural (no presente estudo).

Os animais foram coletados no decorrer desses anos (2004 a 2006), com o intuito de se obter amostras nos diferentes estágios do ciclo reprodutivo,

dependendo do ambiente em que o animal foi capturado. É importante salientar que não foi possível comparar o desenvolvimento testicular entre os animais dos diferentes grupos experimentais, devido à ausência de machos no cativeiro.

A área de estudo do presente trabalho, compreendendo os três ambientes estudados, está ilustrada na figura 02.

3.3 – Obtenção de dados biológicos

Os exemplares capturados no grupo experimental 01 foram acondicionados em sacos plásticos contendo água e oxigênio e, logo em seguida foram transportados até o Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Peixes do Núcleo de Ciências Ambientais da Universidade de Mogi das Cruzes (NCA-UMC) para a obtenção dos dados biológicos. Já os animais capturados no grupo experimental 02 foram acondicionados da mesma forma e transportados até o laboratório da Piscicultura da Barragem de Ponte Nova.

Os animais do grupo experimental 03, logo que amostrados nos viveiros da Piscicultura de Ponte Nova (figura 01g), foram transferidos ao Laboratório da Piscicultura para a obtenção dos dados biológicos.

Assim, todos os exemplares após serem capturados foram transferidos para o laboratório para a realização da biometria e retirada das gônadas, da hipófise e amostras de sangue para posterior análise.

3.3.1 – Processamento pós-captura e biometria

Após serem capturados e transferidos para o laboratório, os exemplares foram anestesiados por imersão em água contendo MS-222 (triclaína metanosulfonato – *Sigma Diagnostics INS, St. Louis M.O. USA*) neutralizado com bicarbonato de sódio na proporção de 1g/10L. Em seguida uma amostra de sangue foi coletada por punção da vasculatura caudal, com uso de seringas de 5 ml e agulhas descartáveis previamente heparinizadas (Liquemine – Roche®). O sangue coletado foi transferido para tubos também heparinizados e centrifugado por 10 minutos a 655,2 g. Em seguida o plasma

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

Posteriormente à coleta de sangue, o comprimento total (L_t), que corresponde da ponta do focinho até o término da nadadeira caudal, em posição natural e o comprimento padrão (L_{st}) (da ponta do focinho até o término da coluna vertebral), de cada exemplar coletado, foram aferidos em ictiômetro com 01 milímetro (mm) de precisão, deitando-se o peixe sobre o flanco direito e coincidindo seu focinho com o marco zero do ictiômetro. A massa corporal total (W_t) em gramas (g) foi obtida em uma balança mecânica, com 01 grama (g) de precisão.

Para avaliar as relações morfométricas e as ponderais da tabarana, foram estimados os parâmetros da equação relativa ao comprimento total (L_t) e massa corporal total (W_t) para todos os exemplares capturados, considerando os diferentes grupos experimentais (ambiente natural, ambiente impactado e no cativeiro). Para tanto, os dados de comprimento total e massa corpórea total foram lançados em diagrama de dispersão e pela sua análise verificou-se que a relação entre as duas variáveis é do tipo potencial sendo representada pela equação ($W_t = aL_t^b$), onde a = intersecção e b = coeficiente de regressão.

3.3.2 – Análise macroscópica das gônadas

Logo após a coleta de sangue e registro dos dados morfométricos, os animais foram sacrificados por secção da medula espinhal na altura do opérculo e, em seguida foi realizada uma incisão na região ventral do animal a partir do poro genital, no sentido pôstero – anterior até a região da nadadeira peitoral. Desta maneira, toda a cavidade abdominal do exemplar foi exposta para a análise e retirada de material biológico.

De uma forma geral, as gônadas se localizam na cavidade abdominal, ventralmente aos rins e à vesícula gasosa e dorsalmente ao tubo digestivo e, são ligadas à parede dorsal do celoma pelo mesentério. Para a identificação macroscópica do sexo foram utilizadas como base as classificações de Vazzoler (1996), Wootton (1990) e Zavala-Camin (2004).

Segundo esses autores, os ovários e os testículos são órgãos pares geralmente alongados, com a extremidade anterior terminando em fundo cego e as extremidades posteriores unidas através de um ducto que alcança o poro genital para eliminar os gametas para o meio externo. Os ovários apresentam uma forma bífida e alongada, sendo que, a coloração, o tamanho e a vascularização variam de acordo com o estágio de desenvolvimento ovariano e a espécie em questão. Os testículos são órgãos pares, bem menores que os ovários, inicialmente são tubulares e alongados, e ao longo do desenvolvimento se tornam lobulados e esbranquiçados dependendo também da espécie em questão.

Após a identificação do sexo, as gônadas foram classificadas macroscopicamente de acordo com o seu desenvolvimento gonadal, levando-se em consideração as seguintes características: coloração, tamanho e disposição destas em relação à cavidade abdominal e grau de irrigação sangüínea superficial (vascularização). Em relação aos ovários, foi considerada ainda a visualização ou não de oócitos a olho desarmado e, quando visível, foi levado em consideração o tamanho, a coloração dos oócitos e a homogeneidade. Os testículos (apenas para os grupos experimentais 01 e 02) foram analisados quanto à liberação ou não de sêmen.

Na literatura especializada, são encontradas diversas descrições dos aspectos macroscópicos das gônadas de peixes em relação ao ciclo reprodutivo e as classificações dos estádios de desenvolvimento gonadal não apresentam uma nomenclatura uniforme devido às divisões e subdivisões dos parâmetros utilizados pelos diferentes autores. Neste trabalho, foi estabelecido um padrão na classificação macroscópica das gônadas, levando-se em consideração as descrições dos estádios de maturação gonadal proposto por, West (1990) e Vazzoler (1996), para espécies de peixes em geral e, as descrições macroscópicas do desenvolvimento gonadal proposta por Moreira (1999) para *Salminus brasiliensis* (espécie congênica de *Salminus hilarii*) e as descrições proposta por Takahashi (2006) para *Salminus hilarii* (exemplares capturados no ambiente natural na região do Baixo Rio Sorocaba-SP).

Com base nestes trabalhos, os ovários da tabarana foram classificados macroscopicamente em: repouso, maturação inicial, maturação avançada ou

maduro e regressão ou esgotado dependendo do ambiente em que o animal foi capturado.

Assim, para as fêmeas coletadas nos grupos experimentais 01 e 02 (ambiente natural e ambiente impactado por barragem), os ovários foram classificados macroscopicamente em quatro estádios de desenvolvimento gonadal:

⇒ Repouso: os ovários são muito pequenos e ocupam em torno de um terço da cavidade abdominal, além de apresentar poucos sinais de vascularização. A olho desarmado é possível observar pequenos oócitos opacos;

⇒ Maturação inicial: os ovários são maiores que o estágio anterior, ocupando aproximadamente metade da cavidade abdominal e apresentam sinais de vascularização. É possível observar também oócitos pequenos em seu interior;

⇒ Maduro: os ovários ocupam praticamente toda a cavidade abdominal, apresentam-se muito vascularizados e são observados a olho desarmado vários oócitos grandes;

⇒ Esgotados (desovado): neste estágio de desenvolvimento, os ovários apresentam-se flácidos e com zonas hemorrágicas, ocupando novamente em torno de um terço da cavidade abdominal; em seu interior observam poucos oócitos que são absorvidos no decorrer do tempo. Em seguida os ovários entram no estágio repouso reiniciando o ciclo.

Em relação à classificação macroscópica no ambiente de cativeiro (grupo 03), os ovários foram classificados em quatro estádios de desenvolvimento gonadal, a saber:

⇒ Repouso e maturação inicial: nestes estádios de desenvolvimento gonadal foram levados em consideração às mesmas características apresentadas para os animais coletados no ambiente natural (descrição anterior);

⇒ **Maturação avançada:** neste caso, os ovários ocupam toda a cavidade abdominal, apresentam-se muito vascularizados e são observados vários oócitos grandes em desenvolvimento. Apesar dos ovários neste estágio de desenvolvimento apresentarem características macroscópicas semelhantes ao estágio maduro (observado no ambiente natural), algumas considerações serão discutidas no decorrer deste estudo;

⇒ **Regressão:** neste estágio, os ovários apresentam zonas hemorrágicas com vários oócitos de coloração alaranjada ou branca em seu interior, indicando que os mesmos estão sendo absorvidos (oócitos atrésicos). Este estágio é característico de animais de ambiente impactado, sendo comumente observado no ambiente de cativeiro nas espécies de piracema.

Em relação à classificação macroscópica nos diferentes ambientes, os testículos foram classificados em:

⇒ **Repouso:** os testículos são filiformes, pequenos e de aspecto transparente, ocupando menos de um terço da cavidade abdominal;

⇒ **Maturação inicial:** os testículos aumentam de tamanho em relação ao estágio anterior, com coloração mais esbranquiçada e no decorrer do desenvolvimento tornam-se mais globosos;

⇒ **Maduros:** os testículos são bem desenvolvidos, maiores, mais largos e com coloração branco-leitosa, sendo que, os animais liberam sêmen quando a região abdominal é ligeiramente pressionada;

⇒ **Esvaziados:** os testículos são menores que no estágio anterior, devido ao processo de liberação e posteriormente reabsorção das estruturas testiculares, como por exemplo, os espermatozóides residuais.

É importante salientar que esta classificação macroscópica do desenvolvimento testicular foi utilizada apenas para os animais capturados nos grupos experimentais 01 e 02, pois, no presente estudo não foi possível obter machos no cativeiro.

Após a incisão na região ventral, identificação e classificação macroscópica das gônadas da tabarana, as mesmas foram retiradas e pesadas (em gramas) em balança analítica de precisão, para posteriormente ser calculado o Índice Gonadosomático (IGS). O IGS é calculado dividindo-se a massa total das gônadas pela massa corpórea do animal, multiplicando o resultado por 100 (Vazzoler, 1996), ou seja, demonstra a porcentagem que as gônadas representam da massa corpórea do animal. Este índice é eficiente em demonstrar o estado funcional das gônadas, ou seja, é um indicador das variações individuais da massa corpórea em função do desenvolvimento gonadal.

Após a retirada e determinação da massa dos ovários, inicialmente, o lobo mais uniforme foi selecionado para a retirada de seis porções transversais a partir da região anterior até a região posterior. Este procedimento foi adotado para observar histologicamente as possíveis diferenças no grau de desenvolvimento dos gametas nas diferentes regiões ao longo do comprimento das gônadas. Como foi observada uniformidade no desenvolvimento, nos animais seguintes, os fragmentos de ovários passaram a ser retirados apenas do terço médio de um dos lobos para posterior análise histológica. Em relação aos testículos foi retirado apenas o terço médio de um dos lobos para a análise histológica.

Os fragmentos de gônadas coletados foram fixados em solução de Bouin acético (75% de ácido pícrico, 20% de formol e 5% de ácido acético glacial), por 20 – 24 horas e após este período, as gônadas foram lavadas em água corrente, para a retirada do excesso de fixador do material biológico e em seguida foram transferidos para álcool a 70% até o momento do processamento (Vazzoler, 1981).

É importante salientar que todos os procedimentos adotados no presente estudo para sacrificar os animais estão de acordo com o Comitê de Ética Animal da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) e a coleta dos animais no ambiente natural e ambiente impactado por barragem foi realizada com licença ambiental de captura do IBAMA (licença N° 125 de 29 de dezembro de 2004).

3.3.3 – Análise macroscópica da hipófise

Concomitantemente à coleta das gônadas, os animais foram decapitados na altura do opérculo e em seguida com o auxílio de um pequeno alicate, foram removidos fragmentos da porção superior da caixa craniana até a total exposição do encéfalo. Posteriormente, o encéfalo foi cuidadosamente destacado da caixa craniana e após ser rebatido para a região anterior da cabeça do exemplar, pode-se localizar e visualizar a hipófise. Com o auxílio de uma pinça a glândula foi removida e fixada por 20 – 24 horas em solução de Bouin acético e, após este período no fixador, o material também foi lavado em água corrente para retirar o excesso de solução de Bouin e, em seguida o material foi transferido para álcool a 70% até o momento do processamento.

É importante salientar que, não foi possível retirar a hipófise juntamente com o encéfalo (figura 03a), pois ao rebater o encéfalo para a região anterior da cabeça para localizar e visualizar a hipófise e posteriormente retirar a glândula, o pedúnculo hipofisário que conecta o encéfalo à hipófise era rompido. Procurou-se outras maneiras de retirar a glândula juntamente com o encéfalo, pois a hipófise conectada ao encéfalo, facilita a orientação do material na hora de incluir e emblocar a glândula para posterior secção no micrótomo na posição longitudinal da hipófise, porém, isso não foi possível. Assim, o fato da glândula estar separada do encéfalo dificultou a orientação do material na hora de incluir e emblocar a hipófise e de seccioná-la na posição longitudinal, sendo esta posição a melhor maneira de se obter os cortes histológicos da hipófise para analisar as regiões adeno-hipofisárias. Neste caso, no momento de emblocar a hipófise no *paraplast* (*Erv-Plast – Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda*), procurou-se orientar o material na posição em que, ao seccionar a glândula seja o mais próximo à posição longitudinal. Essa dificuldade de retirar a hipófise conectada ao encéfalo será discutida no decorrer do trabalho e demonstra que o pedúnculo hipofisário em *S. hilarii* é muito delgado.

Para as análises histoquímica e imuno-histoquímica foram utilizadas apenas as hipófises de fêmeas de tabarana.

3.4 – Histologia de gônadas (análise microscópica) de *Salminus hilarii*

Para os estudos de microscopia de luz, as amostras fixadas (ovários e testículos) em diferentes estádios de desenvolvimento gonadal foram processadas conforme as técnicas rotineiras de histologia. As amostras foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol, incluídas e emblocadas em *paraplast* e os cortes de 5 µm de espessura foram realizados em micrótomo (Leica – RM/2155, equipado com lâminas descartáveis). Os cortes obtidos foram montados em lâminas com poli-lisina (*Poly-Lysine Solution – Sigma Diagnostics INS, St. Louis M.O. USA*) diluída em 1:5 (em água destilada), para auxiliar a fixação dos cortes nas lâminas. Posteriormente, neste material biológico foi realizada a coloração de Hematoxilina e Eosina (Behmer *et al.*, 1976). Em seguida, o material foi novamente desidratado, diafanizado e montado com lamínula e goma Damar. O detalhamento do protocolo está descrito no anexo 01.

As lâminas preparadas foram analisadas sob microscopia de luz (*ZEISS – Axioskop2*) e, em um sistema computadorizado de captura de imagens (PIXERA) no Laboratório de Endocrinologia de Peixes no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB – USP). Essa análise proporcionou uma criação de um banco de imagens, compreendendo as diferentes fases do desenvolvimento oocitário e de outras estruturas como os folículos pós-ovulatórios e os oócitos atresícos, além das mudanças morfofuncionais do epitélio germinativo masculino.

Em relação ao desenvolvimento ovariano, foram identificados e descritos os tipos celulares germinativos e suas respectivas características, considerando-se as afinidades tintoriais, os diferentes grupos experimentais e o desenvolvimento gonadal durante o ciclo reprodutivo da tabarana. Neste caso, para identificar o padrão de crescimento dos oócitos de *S. hilarii*, foram considerados os trabalhos de Wallace & Selman (1981); West (1990) e Rocha & Rocha (2006) para espécies de peixes em geral, além dos trabalhos de Takahashi (2006) para *S. hilarii* coletadas no Baixo Rio Sorocaba-SP e Moreira (1999) para *S. brasiliensis* (espécie congênica de *S. hilarii*). Para os

testículos, foram identificadas e descritas as mudanças morfofuncionais do epitélio germinativo durante a espermatogênese, considerando-se também as afinidades tintoriais, os diferentes grupos experimentais e as alterações morfofuncionais durante o ciclo reprodutivo. Essa identificação das mudanças morfofuncionais do epitélio testicular é um novo critério que foi proposto para identificar as alterações no epitélio germinativo durante o ciclo reprodutivo em várias espécies de vertebrados (Grier, 1993; Grier & Lo Nostro, 2000 e Brown-Peterson *et al.*, 2002), e tem sido adotado por vários pesquisadores brasileiros inclusive no presente trabalho.

3.5 – Histologia de hipófise (análise microscópica) de *Salminus hilarii*

Para os estudos de microscopia de luz, as hipófises foram processadas conforme as técnicas rotineiras de histologia de acordo com a metodologia descrita no item 3.4 com pequenas modificações descritas a seguir.

O material foi desidratado, diafanizado, infiltrado e emblocado em *paraplast*. Secções seriadas de 5 µm foram obtidas e, alguns cortes, após serem desparafinizados foram corados com Tricrômio de Mallory, além da coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Behmer *et al.*, 1976). O detalhamento do protocolo está descrito no anexo 01.

As lâminas preparadas foram analisadas sob microscopia de luz (*ZEISS – Axioskop2*) e, em um sistema computadorizado de captura de imagens (*PIXERA*) no Laboratório de Endocrinologia de Peixes no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB – USP).

Neste material foram identificadas as regiões da adeno-hipófise e neuro-hipófise, além das respectivas células adeno-hipofisárias. Foram analisadas também as variações das células adeno-hipofisárias ao longo do ciclo reprodutivo e entre os diferentes grupos experimentais.

3.6 – Imuno-histoquímica das células adeno-hipofisárias de *Salminus hilarii*

Para as reações imuno-histoquímicas, as secções histológicas seriadas obtidas da hipófise foram processadas de acordo com o método SABC (*Streptavidin-Biotin-peroxidase Complex – Dako Cytomation LSAB₂[®] System HRP Liquid DAB – Ref. 0673*).

O material foi desparafinado, hidratado e “lavado” em tampão PBS (*fosfate buffer saline*), com pH 7,6. Em seguida o material foi submetido ao bloqueio da peroxidase endógena com 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) diluído em tampão PBS por 20 minutos. Após este período, os cortes foram lavados em tampão PBS novamente e o bloqueio inespecífico foi realizado com 5% de leite em pó desnatado (Molico[®], sem adição extra de Ca⁺²), diluído em PBS por 20 minutos. Em seguida, o material foi incubado por 24 horas a 4°C com os anticorpos primários nas diluições especificadas na tabela 01. Após o período de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em PBS por 10 minutos e incubados com o anticorpo secundário biotinilado por 30 minutos (anticorpo secundário contido no “kit” *Streptavidin-Biotin-peroxidase Complex – Dako Cytomation*), em seguida lavados novamente com PBS por 10 minutos e incubados com o reagente SABC (*Streptavidin-Biotin-peroxidase Complex – Dako Cytomation*) por mais 30 minutos.

Após a incubação com o reagente SABC, o material foi lavado em PBS (10 minutos) e, em seguida foi revelado com a solução cromogênica DAB (3,3 – diaminobenzidina – *Dako Cytomation LSAB₂[®] System HRP Liquid DAB – Ref. 0673*). Após serem revelados, este material foi contra-corado com Hematoxilina de *Harris* por 2 – 3 minutos. As lâminas foram desidratadas e montadas com lamínula e goma *Damar*. Como controle negativo, algumas lâminas tiveram o anticorpo primário omitido e substituído por PBS. O detalhamento do protocolo está descrito no anexo 02.

As lâminas preparadas foram analisadas sob microscopia de luz e, em um sistema computadorizado de captura de imagens (PIXERA) no Laboratório de Endocrinologia de Peixes no Instituto de Ciências Biomédicas da

Universidade de São Paulo (ICB – USP), criando-se também um banco de imagens para posterior análise.

Os anticorpos primários utilizados no presente trabalho foram: anti-prolactina (anti-PRL), anti-somatolactina (anti-SL), anti-hormônio de crescimento (anti-GH), anti- β -hormônio luteinizante (anti- β -LH) e anti- β -hormônio folículo estimulante (anti- β -FSH). Todos esses anticorpos são de *chum salmon* (*Oncorhynchus keta*) e foram gentilmente doados pelo professor Dr. H. Kawauchi (*School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Iwate, Japan*). Ainda em relação aos anticorpos de salmão (*Oncorhynchus keta*), foram utilizados também os anticorpos anti- β -hormônio luteinizante (anti- β -LH) e anti- β -hormônio folículo estimulante (anti- β -FSH) doados gentilmente pelo Dr. A. Shimizu (*National Research Institute of Fisheries Science, Yokohama, Japan*). A diferença entre o anti- β -FSH e o anti- β -LH do Dr. Shimizu e do Dr. Kawauchi (ambos de *chum salmon*), é que os anticorpos do Dr. Kawauchi são da molécula inteira dos respectivos hormônios (seqüência inteira de peptídeos), já os anticorpos do Dr. Shimizu são de um fragmento conservado dos respectivos hormônios. O fragmento conservado é da região dos peptídeos 92 a 106 para o β -LH e para o hormônio β -FSH, o fragmento é da região do peptídeo 54 a 62.

Além desses anticorpos primários de salmão foram utilizados outros anticorpos, a saber: anti- α - β -gonadotropina e anti- β -gonadotropina de carpa (*Cyprinus carpio*), doados gentilmente pelo professor Dr. J. M. Mancera (*Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, España*) e os seguintes anticorpos de *Fundulus heteroclitus* (*mummichog*): anti- β -hormônio folículo estimulante (anti- β -FSH) do fragmento da região conservada do peptídeo 50 a 60, anti- β -hormônio luteinizante (anti- β -LH) do fragmento da região conservada do peptídeo 91 a 106 e anti- α -gonadotropinas (anti- α -GtH) do fragmento da região conservada do peptídeo 65 a 85. Os anticorpos de *F. heteroclitus* (anti- β -LH; anti- β -FSH e anti- α -GtH) foram doados gentilmente pelo professor Dr. H. Kawauchi (*School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Iwate, Japan*).

Inicialmente, foi realizada uma análise qualitativa (visual) das reações de imuno-histoquímicas considerando-se os seguintes aspectos: número de

células marcadas, morfologia dessas células e intensidade da imuno-reação. Com o decorrer do estudo, para aprimorar as análises das reações de imuno-histoquímicas, além dessa análise qualitativa visual das reações com os anticorpos especificados na tabela 01, o material foi analisado e relacionado com o ciclo reprodutivo, levando-se em consideração o ambiente em que o animal foi capturado.

Para tanto, foram capturadas imagens com o auxílio do sistema PIXERA (sistema computadorizado), no qual, as imagens foram obtidas da seguinte maneira: após serem identificadas as regiões da adeno-hipófise (“*proximal pars distalis*”, “*rostral pars distalis*” e “*pars intermedia*”) foram capturadas cinco imagens de tamanhos de 1260 *pixels* por 960 *pixels* (as cinco imagens seguidas foram capturadas no sentido da esquerda para direita nessas regiões adeno-hipofisárias), levando em consideração as reações específicas de cada imuno-reação. Por exemplo, foram capturadas cinco imagens das reações específicas de imuno-histoquímicas que ocorreram na região da “*proximal pars distalis*” no sentido da esquerda para a direita. A figura 03b apresenta um esquema da forma como as imagens foram capturadas.

As imagens foram analisadas por um programa computadorizado de análise de dados e imagens (MATLAB – *The Math Works INC*). Neste programa de tratamento de imagens, é levada em consideração a coloração das imagens, ou seja, é considerada uma cor específica que se deseja analisar numa determinada imagem. Como o resultado da reação de imuno-histoquímica no presente trabalho é de coloração marrom, logo, essa cor foi selecionada para ser analisada em toda a extensão das imagens capturadas. Como as células que não reagiram com a reação de imuno-histoquímica não apresentam a coloração marrom, essas células não são contabilizadas pelo programa. A análise desta cor marrom é realizada *pixel a pixel* em cada imagem, ou seja, o programa percorre toda a extensão da figura analisando *pixel a pixel* a presença da cor selecionada. O resultado desse tratamento de imagens é fornecido relacionando-se a porcentagem de *pixel* marcado com a coloração marrom em relação ao total de células.

As células que não reagiram na imuno-histoquímica (núcleos corados em roxo pela Hematoxilina) foram também contabilizadas da mesma maneira que as células marcadas com as reações de imuno-histoquímica para

posteriormente realizar uma análise relativa da seguinte maneira: dividindo-se o resultado da contagem (*pixel a pixel*) da reação imuno-histoquímica pelo resultado da contagem (*pixel a pixel*) dos núcleos das células que não reagiram na imuno-histoquímica, ou seja, obtiveram-se os resultados da reação imuno-histoquímica em relação ao total de células.

É importante salientar, que este procedimento descrito acima, de análise de captura de imagens, foi adotado para observar as possíveis diferenças morfológicas nas células adeno-hipofisárias em relação ao ambiente em que o animal foi capturado (grupos experimentais) e durante o ciclo reprodutivo. É importante comentar que devido ao fato da hipófise ser retirada da caixa craniana desconectada do hipotálamo, não foi possível uma orientação de forma homogênea do material no momento da inclusão, ou seja, não foi possível orientar a hipófise para ser seccionada na posição longitudinal como mencionado anteriormente no item 3.3.3. Neste caso, procurou-se analisar os cortes histológicos e de imuno-histoquímica que apresentaram o mesmo tamanho e formato nos cortes da hipófise nos diferentes ambientes em que o animal foi capturado.

Todas as lâminas histológicas e de imuno-histoquímica com material biológico de *S. hilarii* (ovários, testículos e hipófises) foram depositadas na coleção científica do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP).

3.7 – Determinação dos esteróides gonadais, testosterona, 17β – estradiol e 17α – hidroxiprogesterona de *Salminus hilarii* durante o ciclo reprodutivo e entre os grupos experimentais

Os esteróides gonadais, testosterona (T), estradiol (E_2) e 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP) foram quantificados no plasma dos animais por elisaimunoensaio (ELISA), utilizando-se “kits” comerciais (DSL – *Diagnostic System Laboratories*, INC). Esses “kits” comerciais envolvem o uso de placa de ELISA com anticorpos específicos, sendo que, o procedimento para o uso desses “kits”, foi conforme as especificações do fabricante.

O princípio do método desses ensaios hormonais envolve a ligação competitiva do anticorpo específico presente na placa de ELISA com o hormônio presente no plasma do animal e/ou o hormônio marcado do “kit”. Desta forma, quanto maior a quantidade de hormônio presente no plasma do animal, menor vai ser a reação entre o anticorpo e o hormônio marcado do “kit”, e conseqüentemente, menos intensa será a formação do complexo anticorpo-hormônio marcado, o que resulta em leituras com menores valores de absorbância no espectrofotômetro.

As leituras das placas foram realizadas em leitora de microplaca (Tecan – *SunriseTM – Absorbance Reader*) a um comprimento de onda de 450 nanômetros (nm) para a testosterona (T), para o estradiol (E₂) e para a 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP). O detalhamento do protocolo está descrito no anexo 03.

3.7.1 – Validação dos “kits” comerciais de ELISA

A maioria dos ensaios hormonais disponíveis no mercado foi desenvolvida para humanos e são ensaios rápidos e simples de usar, sendo freqüentemente utilizada para dosagem hormonal em peixes, desde que adequadamente validados para a espécie em questão (White & Fletcher, 1984; Gazola *et al.*, 1996, Venturieri, 1997 e Moreira, 1999).

A validação dos ensaios hormonais no presente estudo, foi realizada conforme as descrições de White & Fletcher (1984), Gazola *et al.*, (1996), Venturieri, (1997) e Moreira, (1999), sendo realizados ensaios de validação para: coeficiente de variação intraensaio. A validação consiste em verificar alterações nos resultados das dosagens de uma mesma amostra por um mesmo “kit”, ou seja, foi ensaiada a concentração hormonal de uma mesma amostra utilizando o mesmo “kit” em diferentes sítios da placa de ELISA (duplicata). Nessa validação, os valores obtidos foram comparados e calculada a porcentagem de variação entre os mesmos.

3.8 – Análise de dados

Para a análise dos resultados, os dados coletados foram agrupados por estágio de desenvolvimento gonadal, levando-se em consideração o ambiente em que o animal foi capturado. As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando-se a análise de variância (*one-way ANOVA*) e no caso dos resultados cumprirem os requisitos de uma análise paramétrica, os mesmos foram comparados utilizando-se o teste de *Student-Newmann-Keuls* (*SNK*). Para os dados que não cumpriram esse requerimento, o teste *Dunn's* ou o teste de *Tukey* foram aplicados (teste não paramétrico). As análises foram realizadas, utilizando-se o programa estatístico *SigmaStat for Windows* (*Version 3.10 Copyright*®). Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM), adotando-se o nível de significância de 95%, onde o $P \leq 0,05$ (Zar, 1984).

4 – Resultados

4.1 – Caracterização dos lotes experimentais (dados biológicos)

4.1.1 – Amostras

No grupo experimental 01 (ambiente natural) durante o período de abril de 2004 a outubro de 2005 foram capturadas no total, 25 tabaranas, com comprimento total variando de 24 cm a 52,5 cm, com média de 40,5 cm e massa corpórea média de 782,4 g (tabela 02).

A composição das amostras, analisadas por sexo, está ilustrada na tabela 02, que mostra que foram capturadas 22 fêmeas, com comprimento total variando de 25 cm a 52,5 cm, com média de 41,88 cm e média de massa corpórea de 853,6 g. Em relação aos machos, foram capturados ao todo, 3 exemplares, com comprimento total variando de 24 cm a 35,5 cm, com média de 30 cm e massa corpórea média de 260 g.

A tabela 02 mostra também a composição da amostra por estágio de desenvolvimento gonadal. Além disso, nesta tabela, é possível observar que foram capturados animais no estágio de regressão no grupo experimental 01, sendo a presença desse estágio de desenvolvimento nesse ambiente será discutida neste trabalho.

A relação estimada entre a massa corpórea total (W_t) e o comprimento total (L_t) foi:

$$\Rightarrow \text{para todos os dados: } W_t = 0,0016L_t^{3,5107} \text{ (R}^2 = 0,9668 \text{ N = 25);}$$

A figura 04 apresenta os valores da relação entre a massa corpórea total e comprimento total, considerando-se todos os animais capturados no ambiente natural.

Em relação ao grupo experimental 02 (ambiente impactado por barragem), entre os meses de maio de 2004 e setembro de 2005 foram capturadas ao todo, 23 tabaranas, com comprimento total variando de 26 cm a 49,8 cm, com média de 35,45 cm e massa corpórea média de 523,04 g (tabela 03).

A composição da amostra, analisadas por sexo, é representada na tabela 03, sendo que, foram capturadas ao todo 16 fêmeas, com comprimento total de 32,5 cm a 49,8 cm, com média de 38,24 cm e massa corpórea média de 639,06 g. Em relação aos machos, foram capturados ao todo 7 exemplares, com comprimento total variando de 26 cm a 32 cm, com média de 29,1 cm e massa corpórea média de 257,86 g. A tabela 03 apresenta a composição da amostra por estágio de desenvolvimento gonadal.

A relação estimada entre a massa corpórea total (W_t) e o comprimento total (L_t) foi:

$$\Rightarrow \text{para todos os dados: } W_t = 0,0061L_t^{3,157} \text{ (R}^2 = 0,9296 \text{ N} = 23\text{);}$$

A figura 05 apresenta os valores da relação entre a massa corpórea total e comprimento total, considerando-se todos os animais capturados no ambiente impactado por barragem.

No grupo experimental 03 (ambiente de cativeiro), durante o período de setembro de 2005 e agosto de 2006 foram realizadas cinco coletas, sendo amostrados 4 animais por coleta. É importante salientar, que ocorreu a perda de um indivíduo durante este período de amostragem.

A composição amostral por estágio de desenvolvimento ovariano consta na tabela 04. Foram capturados 5 exemplares no estágio repouso, 5 no estágio maturação inicial, 7 exemplares no estágio maturação avançada e 6 exemplares em regressão gonadal, totalizando 23 animais no ambiente de cativeiro. O comprimento total das fêmeas variou de 31,5 a 39,5 cm, com média de 35,25 cm e massa corpórea média de 533,52 g (tabela 04).

É importante salientar que o estágio esgotado não ocorre em animais de ambiente de cativeiro, entretanto com o intuito de comparar os resultados obtidos no presente estudo entre os animais capturados em diferentes

ambientes, optou-se por agrupar o estágio regressão com o estágio esgotado, denominando assim o estágio regressão/esgotado. Esse agrupamento foi necessário para poder comparar os animais capturados em diferentes ambientes e será discutido no decorrer do trabalho.

A relação estimada entre a massa corpórea total (W_t) e o comprimento total (L_t) foi:

$$\Rightarrow \text{para todos os dados: } W_t = 0,0111L_t^{3,022} (R^2 = 0,7292 \text{ N} = 23);$$

A figura 06 apresenta os valores da relação entre a massa corpórea total e comprimento total, considerando-se todos os animais capturados no cativeiro.

4.2 – Análise macroscópica e microscópica das gônadas de *Salminus hilarii*

4.2.1 – Descrição macroscópica e microscópica dos ovários

Os ovários de *Salminus hilarii* são órgãos pares, alongados com a extremidade anterior terminando em fundo cego e as extremidades posteriores unidas através de um ducto que alcança o poro genital. Os ovários localizam-se na cavidade abdominal, ventralmente aos rins e à vesícula gasosa e dorsalmente ao tubo digestivo e, são ligados à parede dorsal do celoma pelo mesentério. Além disso, a coloração, o tamanho e a vascularização variaram de acordo com o estágio de desenvolvimento ovariano, sendo que, no caso da tabarana, nos animais coletados no ambiente natural, os ovários apresentaram as seguintes colorações: avermelhado, verde-claro, verde-acinzentado e marrom (figuras 07a a 07d).

Levando em consideração as características macroscópicas dos ovários entre os animais capturados em diferentes ambientes, foi possível observar que no ambiente natural, no estágio maduro, os ovários apresentam a coloração verde-acinzentada e nos animais que foram mantidos no cativeiro, numa fase de desenvolvimento próximo a este estágio descrito acima,

apresentam a coloração verde-azulada (maturação avançada). Esta diferença na coloração é apresentada nas figuras 07e e 07f, respectivamente.

No que diz respeito à classificação macroscópica de desenvolvimento gonadal, no ambiente natural, foi observada a presença dos seguintes estádios: repouso, maturação inicial, maduro e regressão (tabela 05); já no ambiente impactado por barragem, foram capturados exemplares apenas nos estádios repouso e maduro (tabela 05). As figuras de 07a a 07d apresentam os diferentes estádios macroscópicos de desenvolvimento ovariano encontrados em *S. hilarii*. É importante salientar, a ocorrência de animais no estágio regressão no ambiente natural (6 exemplares), pois este estágio de desenvolvimento gonadal geralmente não é observado em animais de ambiente natural e sim em animais de cativeiro. Em relação ao grupo experimental 03 (cativeiro), foram capturados animais nos seguintes estádios: repouso, maturação inicial, maturação avançada e regressão/esgotado (tabela 05).

Devido à íntima relação entre o processo de maturação gonadal (desenvolvimento oocitário) e o aumento do volume e, conseqüentemente, da massa dos ovários, o índice gonadossomático (IGS) é muito importante, pois a variação temporal do IGS fornece indicações seguras sobre o período reprodutivo de uma espécie (Vazzoler, 1996).

A variação dos valores médios do IGS calculado para os exemplares de *S. hilarii*, capturados nos diferentes grupos experimentais (para todas as fêmeas), está apresentada na figura 08. Na tabela 06 constam as suas descrições estatísticas.

Os dados da tabela 06 mostram que os valores de IGS aumentam independente do ambiente em que o animal foi capturado, ou seja, à medida que a maturação avança o IGS aumenta, diminuindo apenas no estágio regressão/esgotado (em ambos os grupos experimentais), o que demonstra o desenvolvimento das gônadas durante a fase reprodutiva de *S. hilarii*.

O índice gonadossomático varia de acordo com o desenvolvimento da gônada, quanto maior a sua massa, maior é o valor obtido, e *vice versa*. As fêmeas capturadas no ambiente natural (rio) apresentam no estágio de repouso IGS variando em 0,83 a 1,06 com valor médio de $0,99 \pm 0,04$ e no estágio de maturação inicial o IGS foi de 1,38. No estágio maduro (ambiente natural) o

IGS variou de 4,99 a 18,51 com valor médio de $10,80 \pm 1,66$ e, no estágio regressão/esgotado o IGS variou de 1,60 a 2,46 com valor médio de $1,95 \pm 0,12$.

No ambiente impactado por barragens, o IGS para as fêmeas variou de: 0,57 a 0,94 no repouso com valor médio de $0,72 \pm 0,06$ e, para o estágio maduro de 5,46 a 14,85 com valor médio de $9,97 \pm 0,92$.

No cativeiro, o IGS variou de 0,43 a 0,82 no estágio repouso com valor médio de $0,68 \pm 0,08$; 1,33 a 2,20 para o estágio maturação inicial com valor médio de $1,71 \pm 0,18$; 5,32 a 14,27 para o estágio de maturação avançada com valor médio de $9,96 \pm 1,05$ e para o estágio regressão/esgotado, o IGS variou de 2,09 a 15,40 com média de $8,45 \pm 1,88$.

Ao analisar os valores do IGS durante o ciclo reprodutivo em cada grupo experimental (para fêmeas), observa-se que nos três ambientes ocorre um aumento significativo do IGS quando as fêmeas em repouso são comparadas com aquelas maduras ou em maturação avançada ($P = 0,001$ em todos os grupos experimentais) (tabela 06).

No que diz respeito às variações do IGS entre os grupos experimentais levando em consideração o ciclo reprodutivo (tabela 06), no estágio repouso, o IGS apresentou diferenças significativas entre os grupos, sendo maior no rio do que no ambiente de cativeiro e no ambiente impactado por barragem ($P = 0,010$). Em relação à fase de regressão/esgotado, o IGS também apresentou diferenças significativas entre os grupos, sendo maior no ambiente de cativeiro do que no ambiente natural (Rio) ($P = 0,004$).

De uma forma geral, essas mudanças macroscópicas observadas nos ovários durante o ciclo reprodutivo, como por exemplo, aumento de tamanho, mudança na coloração, variações dos valores de IGS, entre outras características, refletem a dinâmica do desenvolvimento oocitário, mas nem sempre é possível, a olho desarmado, verificar o desenvolvimento das células germinativas. Desta maneira, se reveste de suma importância caracterizar o desenvolvimento oocitário da espécie através da análise microscópica dos cortes de gônadas, o que permite, por exemplo, identificar com exatidão as etapas do ciclo reprodutivo (maturação dos oócitos, migração da vesícula germinativa, ocorrência de desova entre outros aspectos).

As análises dos cortes histológicos dos ovários levando em consideração as características morfológicas do citoplasma, do núcleo, das membranas, do tamanho dos oócitos, a afinidades aos diferentes tipos de corantes utilizados e, os ambientes em que os animais foram capturados, permitiram identificar as diferentes fases de desenvolvimento em que os oócitos presentes nos ovários da tabarana passam durante o ciclo reprodutivo.

Neste caso, como mencionado anteriormente, para identificar o padrão de crescimento nos oócitos de *S. hilarii*, foram considerados os trabalhos de Wallace & Selman (1981); West (1990) e Rocha & Rocha (2006) para espécies de peixes em geral, além dos trabalhos de Takahashi (2006) para *S. hilarii* coletadas no Baixo Rio Sorocaba-SP e Moreira (1999) para *S. brasiliensis* (espécie congênica de *S. hilarii*). Assim, os tipos oocitários foram: oogônias, oócitos perinucleolares, oócitos corticais alveolares, oócitos vitelogênicos, oócitos maduros, além de estruturas decorrentes do desenvolvimento oocitário, como os folículos pós-ovulatórios e os oócitos atrésicos, que são descritos a seguir, levando-se em consideração cada grupo experimental.

No grupo experimental 01, foi possível identificar as seguintes fases de desenvolvimento oocitário e suas estruturas derivadas desse desenvolvimento ovariano:

⇒ **Oócitos na fase de cromatina-nucléolo (oogônias):** são células germinativas jovens que estão reunidas em ninhos em regiões vascularizadas. São células pequenas, com um núcleo arredondado e o citoplasma é escasso (figura 09a);

⇒ **Oócitos na fase perinucleolar:** esses oócitos se separam dos ninhos de oogônia devido ao seu aumento de tamanho. O citoplasma é fortemente basófilo em relação às oogônias. Os oócitos perinucleares estão presentes em todos os estádios de desenvolvimento ovariano (figura 09b). Estes oócitos contêm também múltiplos nucléolos de tamanhos diferentes na periferia nuclear (figura 09c). Uma fina camada folicular envolvendo o oócito pode ser observada nesta fase de desenvolvimento (figura 09d). É possível observar que alguns oócitos perinucleolares estão em uma fase mais avançada, pois, são bem maiores e apresentam um número maior de nucléolos na periferia do núcleo. Além disso, esses oócitos perinucleolares mais

avanzados apresentam um citoplasma menos basófilo, e o epitélio folicular envolvendo toda a superfície do oócito é mais facilmente identificado (figura 09e). Ainda nesta fase, esse epitélio é fino, tornando-se mais proeminente em fases mais avançadas do desenvolvimento oocitário. Entre essas células foliculares e o oócito, começa o desenvolvimento de uma camada acelular, denominada de zona radiata, ou pelúcida. A figura 09b mostra os dois oócitos perinucleolares encontrados nessa fase de desenvolvimento ovariano (um oócito perinucleolar mais inicial e outro em uma fase mais avançada). É importante observar a diferença no diâmetro dos dois oócitos;

⇒ **Oócito na fase cortical-alveolar:** essa fase é caracterizada pelo surgimento de estruturas citoplasmáticas esféricas (deposição lipídica), semelhantes a vacúolos aparentemente vazios, localizados no citoplasma cortical, próximas à membrana. Esses oócitos são caracterizados por estarem em um processo de vitelogênese lipídica, representando a transição entre a fase pré-vitelogênica e vitelogênica (figura 09f). A zona radiata aparece mais espessa (figura 09f) e as estriações radiais são mais nítidas quando observadas em um maior aumento no microscópio;

⇒ **Oócitos na fase de vitelogênese:** o oócito aumenta de tamanho devido à deposição de vitelo de origem endógena e exógena (figura 09g). Os glóbulos de vitelo distribuem-se por todo o citoplasma e o núcleo apresenta contorno irregular. No início dessa fase a posição do núcleo é central ou levemente excêntrica, evidenciando nucléolos menores. As camadas foliculares e a zona radiata não apresentam mudanças em relação à fase anterior;

⇒ **Oócitos na fase madura:** nos animais de ambiente natural, o processo de maturação final inicia-se quando os exemplares estão próximos à ovulação. Neste caso, ocorre a migração do núcleo (ou também chamado de vesícula germinativa) em direção à micrópila, região localizada na periferia do oócito, na qual, ocorre a entrada do espermatozóide e posteriormente a fusão dos núcleos dos gametas (figuras 09h e 10a). Observando apenas a zona radiata é possível identificar as típicas estrias radiais (figuras 10a e 10b). Nota-se também, o núcleo desorganizado e nucléolos na periferia do oócito (figura 10c);

⇒ **Folículo pós-ovulatório:** é uma estrutura enovelada e sem células em seu lúmen, formada durante o período de desova, após a ruptura da camada folicular e liberação do oócito para o meio externo. A camada folicular (granulosa e teca) permanece no ovário após a desova, tendendo a colapsar devido à pressão mecânica. Essa estrutura, com o passar do tempo, também será reabsorvida pelo organismo, sendo assim indicadora de desova iminente (figura 10d);

⇒ **Oócitos atrésicos:** constitui-se de oócitos que, por alguma razão (ambiental – mudanças de temperatura, salinidade, fotoperíodo, entre outros fatores – ou alteração fisiológica), não foram liberados e são absorvidos pelo organismo. Todas as estruturas constituintes de um folículo ovariano (oócitos e camadas foliculares) serão absorvidas. Os grânulos de vitelo, quando presentes, perdem sua individualidade, constituindo uma massa amorfa de substância acidófila. O aspecto é de um oócito sem forma, apresentando vacúolos dependendo da fase de degeneração (figuras 10e e 10f), sendo observado também um floculado amarelado (figura 10e). O oócito atrésico pode ocorrer em qualquer fase de desenvolvimento oocitário.

No ambiente impactado por barragem (grupo 02), foi possível identificar as mesmas fases do desenvolvimento oocitário descrito acima para os animais capturados no ambiente natural, exceto os folículos pós-ovulatórios.

Em relação ao desenvolvimento oocitário dos animais capturados no cativeiro (grupo 03), não foi possível encontrar os oócitos na fase madura e os folículos pós-ovulatórios. As outras fases de desenvolvimento oocitário foram observadas e apresentam as mesmas características mencionadas acima. É importante salientar que geralmente os oócitos maduros não são observados em animais de cativeiro, pois, esses animais não atingem a maturação final sem a interferência hormonal (geralmente não ocorre a migração do núcleo e “quebra da vesícula germinativa”). Assim, nos animais capturados no cativeiro foram identificados os oócitos na fase vitelogênica (figura 09g) que corresponde à maturação avançada nestes animais.

Como mencionado anteriormente, é possível encontrar na literatura especializada diversas descrições macroscópicas das gônadas em relação ao ciclo reprodutivo. No presente estudo, levando-se em considerações as observações macroscópicas e microscópicas, além dos valores individuais de IGS, foi estabelecida uma escala de maturação gonadal para fêmeas de *S. hilarii* capturadas no ambiente natural.

⇒ Repouso: macroscopicamente, os ovários da tabarana são pequenos, finos e apresentam coloração clara (alaranjado) (figura 07a). Microscopicamente, no interior dos ovários foram observadas as oogônias, os oócitos perinucleolares iniciais e avançados (em alta frequência) e alguns oócitos cortical-alveolar. O aspecto microscópico geral está representado na figura 11a. A média do IGS foi de $0,99 \pm 0,04$ (tabela 06);

⇒ Maturação inicial: macroscopicamente, os ovários da tabarana apresentam-se mais espessos que o estágio anterior e mais irrigado (apresentam-se mais vascularizados) e a sua coloração é verde-clara (figura 07b). Microscopicamente, no interior dos ovários foram observados os oócitos perinucleolares iniciais e avançados, além de vários oócitos corticais alveolares (este último com maior frequência) e alguns vitelogênicos. O aspecto microscópico geral é ilustrado na figura 11b. A média do IGS foi de 1,38 (tabela 06);

⇒ Maduro: macroscopicamente, os ovários da tabarana ocupam praticamente toda a cavidade abdominal, são mais vascularizados e a coloração é verde-acinzentada (figura 07c). Além disso, é possível observar vários oócitos grandes a olho desarmado. Microscopicamente, no interior dos ovários foram observados os oócitos vitelogênicos e os oócitos maduros (com maior frequência), raros oócitos corticais alveolares e alguns oócitos perinucleolares. A figura 11c apresenta o aspecto microscópico geral de um ovário no estágio maduro. A média de IGS foi de $10,80 \pm 1,66$ (tabela 06);

⇒ Regressão/esgotado: os ovários apresentam-se flácidos, com zonas hemorrágicas e, em seu interior observam-se poucos oócitos grandes e a sua coloração é marrom (ovários no estágio esgotado). Microscopicamente, no interior desses ovários são frequentemente observados os folículos pós-

ovulatórios, alguns oócitos maduros, vitelogênicos e oócitos perinucleolares. Os ovários no estágio regressão apresentam-se de tamanho menor, flácidos e com vários oócitos brancos que podem ser observados a olho desarmado (figura 07d). Microscopicamente, no seu interior são observados vários oócitos atrésicos em diversas fases de degeneração, além de oócitos maduros, vitelogênicos e oócitos perinucleolares. A figura 11d, ilustra o aspecto microscópico geral de um ovário na fase regressão. É importante salientar que, no presente trabalho, não foi observado macroscopicamente o estágio esgotado, entretanto, foi identificado microscopicamente, no interior desses ovários, alguns folículos pós-ovulatórios (figura 10d) e alguns oócitos atrésicos (figuras 10e e 10f). Neste contexto, o aspecto macroscópico geral observado é de ovário no estágio em regressão, com vários oócitos brancos e de coloração marrom (figura 07d), entretanto, o aspecto microscópico geral é de um ovário parcialmente esgotado (oócitos atrésicos e folículos pós-ovulatório). A média de IGS foi de $1,95 \pm 0,12$ (tabela 06). O agrupamento em uma única escala (regressão/esgotado) será discutido a seguir no decorrer do trabalho.

No ambiente impactado a escala de maturação criada levando em considerações as observações macroscópicas, microscópicas e os valores individuais do IGS, foram: repouso e maduro, cuja média de IGS foi de $0,72 \pm 0,06$ e $9,97 \pm 0,92$ respectivamente. As características macroscópicas e microscópicas foram as mesmas apresentadas para a escala de maturação descrita para os animais capturados no ambiente natural.

A escala de maturação estabelecida para os animais capturados no ambiente de cativeiro foi respectivamente:

⇒ Repouso e maturação inicial: essas escalas de maturação gonadal apresentaram as mesmas características macroscópicas e microscópicas que os animais capturados no ambiente natural. Os valores médios de IGS foram respectivamente: $0,68 \pm 0,08$ e $1,71 \pm 0,18$ (tabela 06);

⇒ Maturação avançada: macroscopicamente os ovários ocupam praticamente toda a cavidade abdominal, apresenta bastantes sinais de vascularização e a sua coloração é verde-azulada (figura 07f).

Microscopicamente são observados oócitos vitelogênicos (alta frequência) e alguns oócitos perinucleolares. Não foram observados oócitos maduros neste grupo experimental. O valor médio do IGS foi de $9,96 \pm 1,05$ (tabela 06);

⇒ Regressão/esgotado: os ovários da tabarana apresentaram-se macroscopicamente flácidos, de tamanho menor em relação à fase anterior (maturação avançada) e, são observados a olho desarmado, vários oócitos de coloração branca. Microscopicamente, foram observados vários oócitos vitelogênicos e em início de atresia (figura 10e) e alguns oócitos perinucleolares iniciais e avançados. A média do IGS foi de $8,45 \pm 1,88$ (tabela 06).

4.2.2 – Descrição macroscópica e microscópica dos testículos

Os testículos de *S. hilarii* são órgãos pares, tubulares e alongados e bem menores que os ovários, e que durante o desenvolvimento se tornam lobulados e esbranquiçados. A localização dos testículos na cavidade abdominal é a mesma dos ovários (figuras 12a e 12b).

Para a descrição do desenvolvimento testicular, foram considerados os 3 machos capturados no ambiente natural, sendo 2 no estágio repouso e 1 no estágio regressão. No ambiente impactado por barragem foram capturados 7 machos, sendo 2 animais no estágio repouso e 5 maduros. É importante salientar que não foram observadas diferenças nos aspectos macroscópicos entre os animais capturados no ambiente natural e ambiente impactado por barragens. As figuras 12a e 12b apresentam o aspecto macroscópico de desenvolvimento testicular encontrado na tabarana (exceto o estágio repouso).

Macroscopicamente, os testículos de *S. hilarii* apresentam uma variação de tamanho no decorrer do desenvolvimento, o que leva a um aumento de massa corpórea total. Neste caso, a utilização do Índice Gonadosomático (IGS) também é muito importante, como dito anteriormente. As variações dos valores médios desse índice calculado para os exemplares capturados nos diferentes grupos experimentais, estão apresentadas na figura 13. Na tabela 06 constam as suas descrições estatísticas.

No ambiente natural, o IGS dos machos variou de 0,45 a 1,41 com valor médio de $0,93 \pm 0,47$; no estágio regressão o IGS foi de 1,12. Já no ambiente impactado por barragem, o IGS para os machos variou de 0,44 a 0,83 com valor médio de $0,64 \pm 0,20$ para o estágio repouso e de 3,43 a 6,53 com valor médio de $5,13 \pm 0,58$ para o estágio maduro.

A variação dos valores médios do IGS dos machos de *S. hilarii* capturados nos diferentes grupos experimentais está apresentada na figura 13 e as descrições estatísticas estão detalhadas na tabela 06.

O pequeno número de machos coletados torna o tamanho amostral insatisfatório do ponto de vista estatístico. No entanto, apesar do pequeno número de machos capturados, as análises histoquímicas dos testículos, permitiram identificar as células de linhagens germinativas. Essa identificação foi realizada obedecendo-se a ordem do processo espermatogênico, com base nas características observadas na microscopia de luz, além das estruturas testiculares (características morfológicas do citoplasma, núcleo e tamanho das células):

⇒ **Espermatogônias:** são as maiores células da linhagem germinativas se comparadas com espermatócitos e espermátides. São as células mais fáceis de serem identificadas no epitélio germinativo devido ao seu tamanho, por serem esféricas e por apresentarem núcleo grande de posição central (figuras 14a e 14c). O citoplasma dessas células é abundante e pouco corado;

⇒ **Espermatócitos:** são células germinativas bem menores se comparados com as espermatogônias, devido à diminuição do volume citoplasmático (figura 14a). O núcleo ainda é central e essas células ainda continuam em ninhos delimitados pelas células de Sertoli. O citoplasma desta célula é pouco distinguível, devido ao pequeno volume;

⇒ **Espermátides:** são as menores células que permanecem em cistos (pequenas células esféricas), possuem um citoplasma escasso e são densamente coradas (figuras 14a e 14c);

⇒ **Espermatozóides:** essas células apresentam flagelos, e no momento em que ocorre o rompimento dos cistos, os espermatozóides são

liberados para o túbulo seminífero (figura 14b). Essas células também são densamente coradas como as espermatídes, mas não se apresentam em forma de cistos;

⇒ **Células de Sertoli:** o citoplasma dessa célula é escasso, núcleo basófilo e evidente. O aspecto morfológico é de uma célula com forma piramidal e com um contorno irregular, além do núcleo na periferia da célula. É possível observar os prolongamentos dessas células (figura 14c);

⇒ **Tecido intersticial:** nesse tecido foram observadas células de musculatura lisa, vasos sanguíneos, além das células de Leydig, que possuem citoplasma acidófilo (figura 14d).

Entre os animais capturados nos diferentes ambientes, não foram encontradas diferenças no desenvolvimento testicular de *S. hilarii*, e como já foi citado, o tamanho amostral não permitiria esse tipo de análise.

Adicionalmente, no compartimento dos testículos de *S. hilarii*, foi observado que as espermatogônias estão distribuídas por toda sua extensão, podendo ser classificado como do tipo espermatogonial irrestrito. Este tipo de distribuição das espermatogônias será discutido no decorrer do trabalho.

Da mesma maneira que foi criada uma escala de maturação gonadal para os ovários da tabarana, criou-se uma escala de maturidade para os testículos da tabarana, levando-se em considerações as observações macroscópicas e microscópicas, além dos valores individuais de IGS. Abaixo segue a escala de maturidade gonadal para os animais capturados no ambiente natural (grupo 01):

⇒ **Repouso:** macroscopicamente os testículos são pequenos, filiformes, apresentam coloração esbranquiçada, contorno irregular e estendem-se até a região anterior da cavidade abdominal. Microscopicamente, os ductos testiculares apresentam cistos com células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento (espermatogônias, espermatócitos e espermatídes), além de apresentar um epitélio germinativo contínuo (figura

14f), ou seja, em todo o contorno dos ductos foi observada a presença de cistos germinativos em toda a área. Os valores de IGS constam na tabela 06;

⇒ Regressão: macroscopicamente os testículos apresentam uma redução de tamanho em relação à fase madura (a ser descrita na barragem), além de apresentar um aspecto hemorrágico (figuras 12a e 12c). Microscopicamente o diâmetro dos ductos vai sendo reduzido e consequentemente, o volume testicular também é reduzido. Além disso, neste estágio é possível observar que o epitélio germinativo é descontínuo, com células de Sertoli e espermatogônias dispersas ao longo dos ductos. O aspecto microscópico geral está apresentado na figura 14g. Os valores de IGS constam na tabela 06.

Não foram encontradas diferenças no aspecto macroscópico e microscópico entre os animais dos grupos experimentais 01 e 02 no estágio repouso. Pode-se dizer, que a escala de maturidade gonadal do grupo experimental 02 é a mesma utilizada para os animais capturados no ambiente natural (descrito acima). Para o estágio maduro, o aspecto macroscópico e microscópico é descrito abaixo:

⇒ Maduro: macroscopicamente os testículos ocupam um espaço considerável na cavidade abdominal e apresentam a coloração esbranquiçada (figuras 12b e 12d). Microscopicamente, os lúmens dos ductos testiculares apresentam-se repletos de espermatozóides, além de apresentar um epitélio germinativo descontínuo (figura 14e), no qual, observam-se áreas desprovidas de revestimento (cistos germinativos) e áreas onde permaneciam esses cistos com células em todas as fases de desenvolvimento (mencionado anteriormente). O aspecto microscópico geral está apresentado na figura 14h. Os valores de IGS constam na tabela 06

É importante destacar que a presença ou não de um determinado estágio de maturação nos diferentes ambientes está principalmente relacionada com o esforço de captura e não com a presença ou ausência destes estágios no ambiente considerado.

4.3 – Análise macroscópica e microscópica da hipófise de *Salminus hilarii*

4.3.1 – Descrição macroscópica da hipófise

A hipófise de *Salminus hilarii* se localiza na base do diencefalo e estabelece uma relação anatômica e funcional com o hipotálamo através de um pedúnculo hipofisário. A identificação macroscópica da hipófise e do encéfalo é apresentada na figura 03a.

É importante salientar novamente que não foi possível retirar a hipófise juntamente com o encéfalo, pois, ao rebater o encéfalo para a região anterior da cabeça para localizar e visualizar a hipófise e posteriormente retirar a glândula, o pedúnculo hipofisário que conecta o encéfalo à hipófise é rompido.

O número de hipófises utilizada em cada grupo experimental assim como a média de comprimento total e massa corpórea das fêmeas utilizadas nas análises histoquímica e imuno-histoquímica por estágio de maturação gonadal, por grupo experimental estão ilustradas na tabela 07.

4.3.2 – Descrição histoquímica e imuno-histoquímica da hipófise

A morfologia da glândula hipofisária de *Salminus hilarii* não difere do padrão encontrado em outros peixes teleósteos. Basicamente, a hipófise da tabarana é dividida em duas regiões distintas: a adeno-hipófise e a neuro-hipófise. A adeno-hipófise pode ser dividida em: *pars intermedia* (PI) e *pars distalis*, sendo esta última subdividida em *rostral pars distalis* (RPD) e *proximal pars distalis* (PPD) (figuras 15a e 15b). Estas subdivisões da adeno-hipófise são observadas em várias espécies de peixes teleósteos. A neuro-hipófise é constituída pela *pars nervosa* que penetra e se ramifica no interior de todas as regiões da adeno-hipófise (figura 15b).

Seis diferentes tipos celulares foram identificadas na adeno-hipófise de *S. hilarii*. As células produtoras de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e as células produtoras de prolactina (PRL) foram identificadas na região da RPD

(respectivamente, figuras 15c e 15d). A figura 16a apresenta apenas a região da RPD com os dois tipos celulares (PRL e ACTH). As células produtoras de hormônio de crescimento (GH) e as células produtoras de gonadotropinas (GtHs) estão situadas na região da PPD (figura 16b para GH e figuras 16c, 16d e 16e para GtH). A região da PPD com as duas células (GH e GtH) está apresentada na figura 16f. As células produtoras de melanotropina (MSH) e as células produtoras de somatolactina (SL) estão presentes na PI (figura 17a para MSH e figuras 17b e 17c para SL). A figura 17d apresenta apenas a região da PI com os dois tipos celulares (MSH e SL).

A RPD de *S. hilarii* foi caracterizada pela presença de células produtoras de PRL e ACTH, como observado em várias espécies de peixes. As células PRL foram coradas utilizando-se o método Tricrômio de Mallory e Ácido Periódico de Shiff. Essas células são fortemente imunorreativas com o anticorpo de salmão (figuras 18a e 18b), sendo que, esta imunorreatividade é confinada à RPD (figura 18a) e não ocorre reação cruzada com nenhuma outra célula da adeno-hipófise. É importante salientar que essas células produtoras de PRL são PAS-negativas (não reage com o método de Ácido Periódico de Schiff), estão organizadas em arranjo cordonal, são células acidófilas (coradas em vermelho) e são de tamanho pequeno (figura 15d).

Já as células produtoras de ACTH que foram identificadas na RPD, foram coradas com o método de Tricrômio de Mallory e Ácido Periódico de Shiff. São células fracamente basófilas, PAS-negativas e estão em arranjo típico ao redor dos ramos maiores da neuro-hipófise (figura 15c), além de apresentar uma disposição fusiforme próximo a esses ramos. As células produtoras de ACTH estão presentes em menor número em relação às células produtoras de prolactina na região da RPD em *S. hilarii*. No presente trabalho não foi realizada a reação de imuno-histoquímica para ACTH devido à indisponibilidade de anticorpo.

A região PI foi caracterizada pela presença das células produtoras de SL e de células produtoras de MSH. As células produtoras de SL foram coradas com os métodos de Tricrômio de Mallory e Ácido Periódico de Shiff. São células fracamente basófilas, PAS-positivas e situam-se em toda a região da PI próximas aos ramos da neuro-hipófise (figura 17c).

No presente estudo, as células produtoras de SL foram fortemente imunorreativas com o anticorpo de salmão (figuras 18c e 18d). Este hormônio (SL) é exclusivamente encontrado em teleósteos e no presente estudo, não ocorreu reação-cruzada com as células produtoras de GH e PRL como visto em outros teleósteos. Entretanto, interessantemente, ocorreu uma reação-cruzada com as células produtoras de GtHs (figura 18e).

As células produtoras de MSH em *S. hilarii* estão presente na região da PI como supracitado e foram coradas com o método Tricrômio de Mallory e Ácido Periódico de Schiff. São células pequenas, fracamente acidófilas e PAS-negativas (figura 17a), e apresentam um arranjo cordonal e situam-se em toda a região da PI. Devido à falta de anticorpos para MSH, não foi realizada reação de imuno-histoquímica para estas células no presente estudo.

A região da PPD foi caracterizada pela presença das células produtoras de GH e GtHs. As células produtoras de hormônio de crescimento foram coradas pelos métodos Tricrômio de Mallory e Ácido Periódico de Schiff, entretanto, elas são PAS-negativas, acidófilas e estão localizadas próximos aos ramos da neuro-hipófise e a vasos sangüíneos. As células GH são fortemente imunorreativas com o anticorpo de salmão como ilustrado nas figuras 18f, 19a e 19b. Além disso, foram localizados aglomerados de células GH na região da PPD e células isoladas também foram imunorreativas, respectivamente ilustradas nas figuras 19a e 19b. Ao utilizar os anticorpos de salmão para anti-GH, não foram observadas reações-cruzadas com nenhuma outra célula da região da adeno-hipófise.

As células produtoras de gonadotropinas são as células mais abundantes na região da PPD em *S. hilarii*. São globosas, PAS-positivas, com o núcleo excêntrico e citoplasma basófilo. No citoplasma dessas células são observados vacúolos que variam de acordo com o estágio do ciclo reprodutivo (figuras 16d e 16e).

Os ensaios de imunorreatividade mostram que as células GtHs de *S. hilarii* com as anti-gonadotropinas de salmão (anti- β FSH e anti- β LH), apresentam uma pequena marcação (figuras 19c a 19f), utilizando-se o anticorpo de salmão doado pelo Dr. H. Kawauchi (figuras 19c a 19f). No entanto, ao utilizar o anticorpo doado pelo Dr. A. Shimizu (também de salmão),

ocorreu uma maior imuno-reação nas células produtoras de β -LH em relação as células produtoras de β -FSH (figuras 20a a 20d).

Ao comparar as reações entre os dois anticorpos de salmão (anti- β -FSH e anti- β -LH), é possível observar que o anticorpo anti- β -LH doado pelo Dr. Shimizu é mais imunorreativo que o anti- β -LH doado pelo Dr. Kawauchi (respectivamente, figuras 20b e 19d). É importante salientar que todos esses anticorpos (anti- β -FSH e anti- β -LH) foram obtidos da mesma espécie de salmão (*chum salmon*), mas o anticorpo doado pelo Dr. Kawauchi é da molécula inteira de β -FSH e β -LH, já o anticorpo doado pelo Dr. Shimizu é de um fragmento conservado da molécula de β -FSH e β -LH. Mesmo apresentando os resultados descritos acima, é importante comentar que essa imuno-reação foi muito fraca em relação aos outros anticorpos utilizados, como por exemplo, as reações com os anticorpos anti-GH e anti-SL (respectivamente, figuras 18f e 18c).

Adicionalmente, foi utilizada a anti-gonadotropina de *mummichog* (*Fundulus heteroclitus*) com o intuito de se obter uma maior imunorreatividade das células gonadotrópicas de *S. hilarii*, entretanto, não foi observada nenhuma marcação utilizando-se os anticorpos β -FSH e β -LH (figuras 20e a 20h). Além desses anticorpos supracitados, utilizou-se também o anti- α GtH dessa mesma espécie de teleósteo, que apresentou uma pequena reação (figuras 21a e 21b).

Ainda em relação às células produtoras de GtHs, as figuras 21c a 21f apresentam as reações de imuno-histoquímicas, utilizando-se respectivamente os anticorpos de carpa α - β GtH e β -GtH. Neste caso, pode-se observar uma maior marcação das células GtHs com os anticorpos de carpa em relação aos anticorpos de salmão (respectivamente, figuras 19c e 19d para anticorpos de salmão e 21c e 21d para anticorpos de carpa). Além de se observar uma maior marcação, ao utilizar os anticorpos de carpa nas células gonadotrópicas da tabarana, pode-se identificar também, que o anticorpo α - β -GtH é mais imunorreativo do que o anticorpo β -GtH (figuras 21c a 21f).

Apesar dessa pequena imunorreatividade das células GtHs da tabarana com as anti-gonadotropinas de salmão, de *mummichog* e de carpa, é possível observar algumas diferenças nas imunorreações. As células produtoras de LH foram mais imunorreativas do que as células de FSH (figuras 20a a 20d para os anticorpos de salmão). Além disso, foi difícil distinguir se

FSH e LH são hormônios produzidos por uma mesma célula ou não, ou seja, em secções histológicas adjacentes obtidas no presente estudo, o uso de anti- β FSH e anti- β LH de salmão, revelam diferentes padrões de distribuições dessas células, porém algumas células GtHs foram imunorreativas com ambos anticorpos (figuras 19e e 19f). Levando em consideração as reações com os anticorpos α - β -GtH e β -GtH de carpa também é possível observar essas diferenças na marcação com os dois anticorpos (figuras 21e e 21f). O anticorpo α - β -GtH é mais imunorreativo do que β -GtH como identificado nas figuras 21c e 21d. O padrão de distribuição dessas células também é diferente em cortes seriados adjacentes (figuras 22a a 22d).

As células produtoras de TSH (hormônio estimulante da tireóide), que também se encontram na região da PPD em várias espécies de teleósteos, não foram observadas em *S. hilarii* devido à indisponibilidade de anticorpos.

Ainda em relação às reações de imuno-histoquímicas com os anticorpos especificados na tabela 01, pode-se observar que não ocorre reação cruzada entre as células produtoras dos seguintes hormônios GH, PRL e SL (figuras 23a a 23g) nas subdivisões da adeno-hipofisárias.

Em geral, o padrão de distribuição das células adeno-hipofisárias de *S. hilarii* (figuras 23a a 23g) não difere do padrão básico encontrado em outros teleósteos. Entre os grupos experimentais também não foram observadas diferenças nesse padrão de distribuição em relação às diferentes regiões adeno-hipofisárias, ou seja, na região da PPD foram identificados as células produtoras de GtHs e GH, na região da PI foram identificadas as células produtoras de SL e MSH e na região da RPD as células ACTH e PRL nos três ambientes grupos experimentais. Entretanto, foram observadas variações morfofisiológicas nas células adeno-hipofisárias durante o ciclo reprodutivo da tabarana, que serão apresentadas a seguir.

4.3.3 – Alterações morfológicas, intensidade de imunorreatividade e frequência de células produtoras de hormônio de crescimento, somatolactina e prolactina durante o ciclo reprodutivo de *Salminus hilarii*

Levando-se em consideração apenas os resultados obtidos com o método de imuno-histoquímica, foi observado que as células adeno-hipofisárias da tabarana apresentaram variações morfofisiológicas durante o ciclo reprodutivo. Analisando-se o número de células marcadas, intensidade de imunorreatividade, morfologia celular, entre outras características, ao primeiro momento (análise qualitativa), identificou-se que as células produtoras de hormônio de crescimento (GH) e somatolactina (SL) variam de acordo com o ciclo reprodutivo e entre os animais coletados nos diferentes grupos experimentais.

Vale ressaltar que, devido a pequena imunorreatividade das células produtoras de gonadotropinas (GtHs), não foram analisadas qualitativamente e quantitativamente durante o ciclo reprodutivo da tabarana.

Variações nas reações imuno-histoquímica para o anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH) foram observadas também durante o ciclo reprodutivo nos animais do ambiente natural (figura 25). As células produtoras de GH na tabarana foram mais abundantes durante a fase repouso (figuras 25a e 25b), diminuindo provavelmente no estágio maturação inicial (não foram coletados animais neste estágio de desenvolvimento gonadal no presente estudo), e no estágio maduro, as células produtoras de GH proeminentemente diminuem a um pequeno número de células imunorreativas (figuras 25c e 25d) se comparado ao estágio repouso. Além disso, o número de células marcadas no estágio regressão, provavelmente é maior do que no estágio maduro (figuras 25e e 25f).

No grupo experimental 02, apesar do pequeno número amostral, nota-se que, no estágio repouso, o número de células marcadas é superior em relação ao estágio maduro (análise qualitativa). Ou seja, é possível observar que ocorre uma diminuição do número de células marcadas com o avanço do desenvolvimento gonadal (figura 26).

Analisando os resultados obtidos na reação imuno-histoquímica (análise qualitativa) o anti-GH para o grupo de cativeiro, observou-se que as células imunorreativas seguem o mesmo padrão de distribuição de frequência que se identificou para os grupos 01 e 02, ou seja, com o desenvolvimento das gônadas, o número de células imunorreativas diminui (figura 24a a 24h).

Contrariamente ao padrão secretor das células de GH, a produção de SL aumenta com o amadurecimento das gônadas nas fêmeas em cativeiro, ou seja, no estágio repouso a região “*pars intermedia*” apresenta um menor número de células imunorreativas com o anti-SL de salmão se comparado ao estágio maturação avançada (figura 27).

No ambiente natural, o número de células imunorreativas com o anticorpo para SL também aumenta com o desenvolvimento gonadal, diminuindo a pequenos grupos de células imunorreativas no estágio regressão (figura 28). No ambiente impactado pela barragem o padrão de variação ao longo do ciclo reprodutivo é o mesmo já descrito para os demais ambientes (figura 29).

Para aprimorar as análises em relação à variação da frequência de células imunorreativas durante o ciclo reprodutivo, foi realizada uma análise quantitativa. A tabela 08 apresenta as variações na quantidade de células imunorreativas com anti-GH analisadas através do programa de análise de imagens e as figuras 31a e 31b apresentam os resultados da análise de imagem com o programa *MATLAB*. O resultado desta análise é uma imagem sem a presença da cor marrom (figura 31b) e, além disso, como já explicado anteriormente, o programa fornece a porcentagem de *pixel* marcado em relação ao tamanho total da imagem.

No intuito de minimizar as possíveis variações na quantidade total de células presentes nas diferentes imagens entre os grupos experimentais, foi analisada, além da reação imuno-histoquímica, a quantidade de núcleos das células que não reagiram com os anticorpos para posteriormente ser realizada uma análise relativa.

Entretanto, devido à proximidade das cores entre o núcleo e o citoplasma dessas células que não reagiram com o anticorpo (além das células presentes nos capilares sanguíneos e da região da neuro-hipófise), não foi possível realizar uma análise relativa com o programa *MATLAB* da mesma

maneira em que foram contabilizadas as células marcadas. O programa contabiliza as áreas das regiões que não foram imunorreativas (região da neuro-hipófise, capilares sanguíneos entre outros), além dos núcleos das células que não reagiram com a imuno-histoquímica (figuras 31c e 31d). Desta maneira não foi possível (com a reação de imuno-histoquímica e com os núcleos das células não marcadas), estabelecer uma análise relativa com total de células presentes em cada imagem capturada, durante o ciclo reprodutivo e entre os diferentes grupos experimentais.

Assim, levando-se em consideração apenas as análises das células marcadas com os seus respectivos anticorpos, foi possível obter esses resultados quantitativos, que são descritos abaixo.

Nas fêmeas do cativeiro, a quantidade de células imunorreativas para o hormônio de crescimento apresentou diferenças estatísticas significativas entre as fases do ciclo reprodutivo, sendo maior para o estágio repouso do que nos estádios de desenvolvimento subsequentes (maturação inicial, maturação avançada e regressão) ($P = 0,001$). Também foi possível observar que nos estádios maturação inicial e maturação avançada, as células apresentam um maior valor de células imunorreativas se comparado com o estágio regressão ($P = 0,001$). Na tabela 08 constam as informações estatísticas das análises quantitativas.

No ambiente natural, foi possível observar que essas células apresentam as mesmas variações de imunoreatividade dos animais capturados no cativeiro, ou seja, fêmeas em repouso apresentam um número maior de células produtoras de GH do que aquelas no estágio maduro. Foi observada, no entanto, uma diferença no estágio regressão, pois nas hipófises das fêmeas do cativeiro as células imunorreativas para GH estão em menor quantidade quando comparadas com aquelas do ambiente natural. No grupo experimental 01, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas na frequência de células imunorreativas durante o ciclo reprodutivo, entretanto é possível observar uma leve tendência na diminuição do número de células marcadas com o decorrer da maturação gonadal.

No ambiente impactado por barragem, observa-se uma pequena variação na reação das células produtoras de GH entre os estádios repouso e maduro. No estágio repouso, observa-se uma maior frequência na marcação

dessas células do que os animais capturados no estágio maduro. Neste grupo também foi possível observar diferenças estatísticas significativas entre os estágios do ciclo reprodutivo ($P = 0,042$). Na tabela 08 constam as descrições estatísticas das análises quantitativas.

Ao comparar a frequência de imunorreatividade das células produtoras de GH nos diferentes estágios de desenvolvimento gonadal e entre os grupos experimentais, foi possível observar que no estágio repouso em animais capturados no ambiente natural apresentam uma menor quantidade de células imunorreativas em comparação ao mesmo estágio de desenvolvimento em animais capturados na barragem ($P = 0,029$) (tabela 08). Já para o estágio regressão, os animais coletados no ambiente natural apresentam um número maior de células imunorreativas do que os animais de cativeiro ($p = 0,001$), no mesmo estágio de desenvolvimento (tabela 08). No estágio maduro não ocorrem diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais.

As células produtoras de somatolactina mostram um padrão de variação no ciclo reprodutivo contrário ao que ocorre com as células produtoras de GH nos animais capturados no ambiente natural. As fêmeas no estágio maduro apresentaram um maior número de células imunorreativas quando comparadas com os estágios repouso e regressão, entretanto, apenas no estágio repouso foi observada diferença significativa ($P = 0,001$). O mesmo perfil ocorreu nas fêmeas maduras quando comparadas com aquelas no mesmo estágio (repouso) na barragem ($P = 0,013$) e no cativeiro ($P = 0,018$) (tabela 09).

Levando em consideração a variação das células produtoras de somatolactina durante o ciclo reprodutivo e entre os grupos experimentais, os resultados mostram que no estágio repouso, as fêmeas no ambiente natural apresentam um número menor de células imunorreativas do que aquelas amostradas nos ambientes impactados ($P = 0,035$). No estágio maduro, foi observado o mesmo perfil, mas com diferença significativa apenas entre os animais coletados no ambiente natural e cativeiro ($p = 0,014$), o mesmo ocorrendo no estágio de regressão ($p = 0,006$) (tabela 09).

As células produtoras de prolactina não apresentaram alterações durante o ciclo reprodutivo na tabarana e em relação aos grupos experimentais

(análise qualitativa), como pode ser constatado na figura 30. Desta forma, não foram realizadas as análise quantitativa para essas células.

4.4 – Perfil plasmático dos esteróides gonadais: testosterona, 17β – estradiol e 17α – hidroxiprogesterona de *Salminus hilarii* durante o ciclo reprodutivo e entre os grupos experimentais

É importante comentar que apenas para estas análises dos esteróides plasmáticos, os animais de cativeiro no estágio de maturação foi subdividido em 3 estádios, a saber: maturação inicial, maturação média e maturação avançada. Estas subdivisões do estágio de maturação serão discutidas no decorrer do estudo.

O perfil plasmático dos hormônios esteróides sexuais: 17β – Estradiol (E_2), testosterona (T) e 17α – hidroxiprogesterona (17α -OHP), está ilustrado nas figuras 32, 33 e 34, respectivamente.

A concentração plasmática de E_2 aumenta concomitantemente ao desenvolvimento das gônadas nos 3 grupos experimentais, diminuindo no estágio regressão/esgotado (tabela 10). O maior valor obtido para o E_2 no ambiente natural foi no estágio maduro ($468,17 \pm 108,71$ pg/ml), diferindo significativamente dos resultados obtidos para o estágio repouso ($84,50 \pm 12,18$ pg/ml) ($P = 0,023$) e para o estágio regressão/esgotado ($162,77 \pm 45,49$) ($P = 0,023$). No ambiente impactado por barragem, o maior valor obtido para o E_2 , também foi no estágio maduro ($397,05 \pm 60,04$ pg/ml), apresentando diferença significava com os animais no estágio em repouso ($81,54 \pm 15,89$ pg/ml) ($P = 0,001$). No cativeiro, o mesmo perfil foi encontrado, com maior concentração de E_2 nas fêmeas no estágio maturação média ($1375,52 \pm 302,74$ pg/ml), diferindo com todos os outros estádios de desenvolvimento gonadal ($P < 0,001$).

Em relação às diferenças entre os diferentes grupos experimentais, nos estádios de maturação pré-estabelecidos, pode-se observar que apenas no estágio regressão/esgotado são encontradas diferenças significativas, com as fêmeas do ambiente natural apresentando maiores concentrações de E_2 , que aquelas do cativeiro ($P = 0,025$) (tabela 10).

O perfil plasmático da T acompanha o mesmo padrão observado para o E_2 nos diferentes grupos experimentais (tabela 10 e figura 33), ou seja, sua concentração aumenta concomitantemente com o desenvolvimento das gônadas. No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas durante o ciclo reprodutivo nos animais capturados no ambiente natural. É importante salientar que não foram observadas diferenças estatísticas nesses grupos experimentais, provavelmente devido ao elevado valor do erro padrão encontrado no presente trabalho.

Em relação ao ciclo reprodutivo da tabarana, no ambiente impactado por barragens, os valores de T apresentaram diferenças significativas entre os estádios de maturação gonadal (tabela 10), diferindo do estágio repouso ($62,22 \pm 25,40$ pg/ml) para o estágio maduro ($181,63 \pm 38,77$ pg/ml) ($P = 0,027$). Já no cativeiro, a maturação inicial foi o estágio de desenvolvimento com menor concentração plasmática de T se comparado com os outros estádios, diferindo estatisticamente com o repouso ($P = 0,031$), com a maturação média ($P = 0,019$) e com a regressão/esgotado ($P = 0,029$). Ao analisar os resultados obtidos para T plasmática, comparando-o durante o ciclo reprodutivo e entre os ambientes, não foram encontradas diferenças significativas (tabela 10 e figura 33).

Considerando-se agora a 17α -OHP, os resultados mostram que também a concentração plasmática aumenta concomitantemente com o desenvolvimento gonadal (tabela 10 e figura 34) como observado para E_2 e T. Em relação aos animais amostrados no ambiente natural, o maior valor obtido foi no estágio regressão/esgotado ($222,00 \pm 48,40$ pg/ml), diferindo dos outros esteróides analisados (T e E_2), encontrados em maior concentração no estágio maduro. No ambiente impactado por barragens, como animais no estágio regressão/esgotado não foram capturados, esta avaliação não pode ser realizada. No entanto, é possível observar que os níveis plasmáticos de 17α -OHP, aumentam com o progresso da maturação gonadal (tabela 10 e figura 34).

No cativeiro, a concentração plasmática de 17α -OHP, também aumenta concomitantemente com o desenvolvimento gonadal (tabela 10 e figura 34), sendo que, o maior valor obtido foi no estágio regressão/esgotado ($595,00 \pm 86,05$ pg/ml). É importante salientar que os animais coletados no

estádio maturação inicial ($360,00 \pm 76,15$ pg/ml) apresentam um valor igual ao comparado com o estágio repouso ($432,50 \pm 131,17$ pg/ml), ao estágio maturação média (390 pg/ml) e ao estágio maturação avançada ($467,50 \pm 107,73$), sem apresentar diferenças significativas.

Comparando-se a concentração de 17α -OHP entre os grupos experimentais em estádios pré-definidos do ciclo reprodutivo, os resultados mostram que os animais de cativeiro apresentam valores superiores aos animais do ambiente natural nos estádios repouso ($P = 0,041$), maturação avançada (maduro no ambiente natural) ($P = 0,015$) e regressão/esgotado ($P = 0,004$) (tabela 10 e figura 34). Entre os animais capturados nos ambientes impactados (barragem e cativeiro), apenas no estágio maturação avançada (cativeiro) foi observada diferença estatística significativa com o estágio maduro (barragem) ($P = 0,006$), ou seja, observa-se uma maior concentração de 17α -OHP no cativeiro em relação ao ambiente impactado por barragem.

No ambiente natural, é possível observar que a concentração de 17α -OHP no estágio repouso, difere estatisticamente com os animais coletados no ambiente impactado por barragem ($P = 0,044$), ou seja, no ambiente natural, observou-se uma menor concentração de 17α -OHP se comparado aos ambientes impactados (ambiente impactado por barragem e cativeiro).

4.4.1 – Validação dos “kits” comerciais de ELISA

Conforme descrito no item 3.7.1 (validação dos “kits” comerciais de ELISA), os “kits” de ELISA foram validados para o plasma de *Salminus hilarii*. Em relação aos coeficientes de variação intraensaio (tabela 11), foram obtidos valores com amplitude de 0,98 – 23,71 % para o estradiol, 2,21 – 27,44 % para a testosterona e 0,58 - 29,05 % para a 17α -hidroxiprogesterona.

5 – Discussão

5.1 – Amostras (dados biológicos)

Na literatura brasileira, existem poucos estudos sobre a biologia geral de *Salminus hilarii* com relação aos dados morfométricos e ponderais, podemos encontrar o trabalho de von Ihering (1929), que mencionou dados a respeito de 3 fêmeas do Rio Mogi Guaçu, com comprimento máximo observado de 36 cm e massa de 556 g. Godoy (1975) relata o comprimento total da maior fêmea registrada entre o período de 1943 e 1970 de 42 cm e para o macho neste mesmo período, o valor de 30 cm de comprimento. Já Nakatani (2001) descreve o comprimento de 35 cm, provavelmente para fêmeas de tabarana e Takahashi (2006) estudando tabaranas capturadas na região do Baixo Rio Sorocaba-SP, registrou o comprimento total máximo para fêmeas de 42,7 cm e para os machos, o valor de 27,5 cm. Além disso, Graça & Pavanelli (2007) registraram o comprimento total máximo de 34 cm para a tabarana coletadas na planície de inundação do Alto Rio Paraná e áreas adjacentes e, Sato *et al.*, (2003), apresentam o valor médio de comprimento total de 23,8 cm e média de massa corpórea de 258,7 g. No presente estudo, foram registrados os maiores valores de comprimento e massa corpórea total para fêmeas e machos respectivamente: 52,5 cm e 35,5 cm e 1830 g e 400g.

De um modo geral, no presente trabalho, analisando-se os comprimentos totais médios relativos a cada grupo experimental (ambiente natural, ambiente impactado por barragem e ambiente de cativeiro), nota-se pouca variação neste parâmetro (respectivamente: tabelas 02, 03 e 04). Todavia, é possível observar que, no ambiente natural capturou-se os maiores exemplares tanto em relação aos machos quanto as fêmeas, com média de comprimento total maior em relação aos exemplares capturados no ambiente impactado e no cativeiro. Ao analisar as diferenças no comprimento total entre os sexos, vale ressaltar que as fêmeas apresentam tamanhos e massas maiores do que os machos, independente dos grupos experimentais. Este padrão de crescimento entre machos e fêmeas é típico de *S. hilarii*, sendo

constatado inicialmente por Godoy em 1975, e em estudos recentes (Takahashi, 2006; Takahashi *et al.*, 2007) e no presente estudo.

De um modo geral, todo crescimento implica em mudanças nas dimensões dos organismos. Os dados de comprimento total e massa corpórea são parâmetros fáceis de serem registrados (Vazzoler, 1981; Bendazoli *et al.*, 1990) e a análise destas variáveis permite descrever a relação entre o comprimento e a massa corpórea, logo, esta relação é uma indicação do crescimento relativo da espécie, podendo-se estimar o comprimento através da massa corpórea obtida e *vice-versa* (King, 1995; Zavala-Camin, 2004). As relações entre o comprimento e a massa corpórea obtidas para a tabarana, refletem adequadamente as variações do incremento destes parâmetros (figuras 03, 04 e 05). Os valores obtidos para o coeficiente angular (b) dessa relação (comprimento – massa corpórea), estão próximos a 3, indicando um crescimento não isométrico, ou seja, pode-se dizer que conforme o peixe cresce, ocorrem mudanças proporcionais entre a sua densidade e dimensões lineares (King, 1995).

Analisando-se a distribuição de número de exemplares entre os grupos experimentais, pode-se notar que esta foi homogênea, sendo capturados 25 animais no grupo 01; 23 exemplares no grupo 02; e 23 animais no grupo 03. Devido à dependência dos pescadores para capturar os peixes para a amostragem, somado a dificuldade de captura da tabarana na região do Alto Tietê e o cronograma de abertura e fechamento das comportas da Barragem de Ponte Nova, não foi possível analisar um número maior de animais no grupo 01 (ambiente natural) e no grupo 02 (ambiente impactado). Além disso, a distribuição da tabarana na Bacia do Alto Tietê está restrita a poucos quilômetros desse Rio, devido às barragens e a poluição doméstica e industrial presentes nesta região. A partir da cidade de Mogi das Cruzes/SP em direção a cidade de São Paulo-SP, não é mais possível encontrar a tabarana no Rio Tietê devido à referida poluição, entretanto, da cidade de Mogi das Cruzes em direção à nascente do Rio Tietê, ainda é possível encontrar algumas populações de peixes, entre elas a tabarana. Para agravar os problemas desta bacia, as barragens (reservatórios) presentes na Bacia do Alto Tietê, podem comprometer ainda mais a ictiofauna presente neste Rio e seus tributários.

Levando em consideração apenas o grupo 02, é importante salientar, que foi levantada a hipótese de se coletar os animais dentro da área do Reservatório da Barragem de Ponte Nova, no entanto, um estudo anterior (Silva *et al.*, 2004) e abordagens junto aos pescadores da região, revelaram que a espécie em questão não está presente no reservatório. Este fato é compreensível, pois desde a construção da Barragem de Ponte Nova na década de 70, a migração da tabarana ficou prejudicada e a distribuição da espécie restrita a um pequeno trecho de rio, que corresponde à jusante desta barragem até a cidade de Mogi das Cruzes/SP. A partir desta cidade o Rio Tietê começa a apresentar problemas com a poluição doméstica e industrial como mencionado anteriormente.

5.2 – Aspectos do ciclo reprodutivo e Índice gonadossomático de *Salminus hilarii*

5.2.1 – Características reprodutivas

As fêmeas de tabarana, *S. hilarii*, apresentam o mesmo padrão anatômico da maioria dos teleósteos. Os ovários são estruturas pares, alongados, dispostos ao longo da vesícula gasosa. Durante a maturação gonadal, ocorre um aumento da sua massa total e a coloração varia de acordo com o grau de desenvolvimento ovariano, sendo avermelhados no início da maturação, modificando-se gradualmente até tornar-se verde-acinzentado ao final da maturação, fato que corrobora os dados encontrados na literatura brasileira sobre os aspectos reprodutivos da tabarana (Godoy, 1975; Takahashi, 2006).

As fêmeas não apresentaram características sexuais secundárias, entretanto, como mencionado anteriormente, a maioria dos machos estava entre as classes de comprimento de 20 a 35 cm, uma amplitude pequena se comparada à das fêmeas, que além de ocuparem esta faixa de comprimento, predominaram a partir dos 40 cm de comprimento total. Além disso, não foram observadas diferenças morfológicas e na disposição anatômica entre os animais capturados nos diferentes grupos experimentais, com exceção da

coloração dos ovários no estágio maduro, que no ambiente natural apresentou-se verde-acinzentada e no cativeiro verde-azulada (estádio maturação avançada).

Essa diferença na coloração das gônadas dos exemplares entre os grupos experimentais (figuras 07e e 07f), provavelmente deve-se às condições nutricionais dos animais, pois, *S. hilarii* é um teleósteo carnívoro (piscívoro) e a disponibilidade de proteína de origem animal no ambiente natural é certamente mais elevada do que nos ambientes impactados. Em relação ao ambiente de cativeiro, a dieta fornecida aos animais é balanceada, fornecendo uma alta porcentagem de proteína bruta, como mencionado anteriormente (40% de teor de proteína estão presentes na ração comercial), entretanto, como os estudos nutricionais para a tabarana em cativeiro são ausentes, atualmente, não se conhece a exigência nutricional protéica de *S. hilarii* em cativeiro, que provavelmente é maior do que os 40% de proteína bruta fornecida na ração comercial (Camargo, 2007).

No que concerne às características gerais dos machos de *S. hilarii*, é encontrado o mesmo padrão anatômico da maioria dos teleósteos. Os testículos são órgãos bem menores que os ovários, pares, tubulares e alongados, que ao longo do desenvolvimento se tornam lobulados e esbranquiçados. A localização dos testículos na cavidade abdominal é a mesma dos ovários.

Os machos de tabarana apresentam nadadeira anal áspera (estão presentes espículas nessa nadadeira), durante a fase de maturação do ciclo reprodutivo, sendo que, ocorre variação no grau de aspereza ao tato bem como na sua frequência em relação ao desenvolvimento gonadal. No presente estudo, essas espículas foram observadas nos animais capturados no ambiente natural e no ambiente impactado por barragens. Entretanto, Moreira (*com. pess.*¹), comenta que os machos de tabarana em cativeiro também apresentam espículas na nadadeira anal, ou seja, apresentam nadadeira anal áspera ao toque, sendo tal característica dentre outras, uma das mais importantes para selecionar os reprodutores para a reprodução artificial em cativeiro.

¹ – Renata Guimarães Moreira. Professora Doutora. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – IBUSP. Rua do Matão, trav.14, 321. CEP 05508-900. São Paulo (SP). Brasil.

A presença de espículas na nadadeira anal de indivíduos machos tem sido comentada em algumas espécies de teleósteos da família Characidae, como por exemplo: *Salminus brasiliensis* (Lima *et al.*, 1986; Weingartner & Zaniboni-Filho, 2005), *Astyanax altiparanae* (Porto-Foresti *et al.*, 2005), *Brycon orthotaenia* (Sato *et al.*, 2003), entre outras espécies. A ocorrência de nadadeira anal áspera ao toque, tem sido considerada uma característica sexual secundária temporária, presentes somente no período de reprodução (Porto-Foresti *et al.*, 2005).

De uma forma geral, é importante destacar que a presença ou não de animais (fêmeas ou machos) ou de um determinado estágio de maturação gonadal nos diferentes grupos experimentais, está principalmente relacionada com o esforço de captura e não com a presença ou ausência desses animais ou destes estádios de desenvolvimento no ambiente a ser considerado.

5.2.2 – Caracterização do desenvolvimento ovariano

Os ovários de *S. hilarii* foram avaliados desde os aspectos macroscópicos até microscópicos. As análises macroscópicas, apesar de permitirem a avaliação da época e local de desova, apresentam algumas desvantagens, pois, são baseadas em características como formato, coloração, disposição dos ovários na cavidade abdominal, tamanho das gônadas entre outras características, que são aspectos subjetivos e facilmente alteráveis, podendo resultar em erros de classificação da escala de maturidade (Vazzoler, 1996).

Devido à subjetividade existente nos dados sobre estágio macroscópicos de desenvolvimento gonadal, baseada apenas em análises macroscópica (por exemplo, tamanho do órgão e coloração do mesmo) como mencionada anteriormente, a utilização de um indicador quantitativo como o Índice gonadossomático (IGS) é muito importante, pois a variação temporal do IGS fornece indicações seguras sobre o período reprodutivo de uma espécie ou de uma população. O IGS juntamente com as análises microscópicas e macroscópicas fornecem um diagnóstico correto da atividade reprodutiva em peixes teleósteos (Vazzoler, 1996).

Os valores de IGS para *S. hilarii* (tabela 06) aumentam independente do grupo experimental, à medida que o estágio de maturação avança, sendo que, o maior valor encontrado de IGS foi registrado quando os animais estavam com os ovários completamente desenvolvidos (estádio maduro ou maturação avançado dependendo do ambiente a ser considerado) e, o menor valor foi observado no estágio repouso, demonstrando assim um bom desenvolvimento das gônadas na fase reprodutiva da tabarana. Essa diferença nos valores de IGS nos grupos experimentais foi devido principalmente ao aumento do tamanho dos ovários.

Godoy (1975) comenta que durante o período reprodutivo, os ovários de tabarana chegam a representar cerca de 10% a 20% da massa corpórea total. Esses ovários são bem desenvolvidos no período reprodutivo e apresentam um número aproximado de 25.000 a 30.000 oócitos, enquanto que para os machos, as gônadas apresentam seu percentual ao redor de 1% (Godoy, 1975). Takahashi (2006) encontrou o maior valor de IGS de $14,78 \pm 3,41$, um valor elevado se comparado ao presente estudo ($IGS = 10,80 \pm 1,66$).

Outro índice importante para que seja avaliado o grau de desenvolvimento do ovário é o cálculo da fecundidade, que implica no número de oócitos a serem eliminados em um evento reprodutivo. Em um projeto paralelo a este, Narcizo *et al.*, (2007a; 2007b) estimou a fecundidade da tabarana considerando os mesmos grupos experimentais que o presente trabalho. Foram encontrados os valores de 51.685 oócitos para o ambiente natural, 35.239 oócitos para o ambiente impactado por barragem e 24.239 oócitos no cativeiro. Já Takahashi, (2006) estimou a fecundidade da tabarana coletada na Região do Baixo Rio Sorocaba/SP o valor de 54.157 oócitos. Adicionalmente, Narcizo *et al.*, (2007a; 2007b) comentam que alguns trabalhos mostram que animais confinados (principalmente os da família Cichlidae) apresentam um aumento da fecundidade, mas às custas desse aumento de número, os oócitos são de menor tamanho (diâmetro) quando comparado aos animais de ambiente natural. No caso de *S. hilarii* foi observado o oposto ao encontrado na literatura, nos ambientes impactados (barragem e cativeiro) ocorre uma diminuição da fecundidade e um aumento no diâmetro dos oócitos vitelogênicos (Narcizo *et al.*, 2007a; Narcizo *et al.*, 2007b). Provavelmente essas diferenças nos valores da fecundidade da tabarana refletiram também

sobre as variações do IGS. Entretanto, apenas no estágio repouso e regressão/esgotado o IGS apresenta diferença significativa entre os grupos experimentais.

O IGS dos animais de cativeiro não diminuiu do estágio maturação avançada para o estágio regressão/esgotado, situação essa que não foi observada para os animais de ambiente natural. Analisando-se a tabela 06 é possível observar que houve uma diminuição do tamanho do ovário (cerca de 5,5 vezes) apresentando diferença estatística significativa ($P < 0,001$) nos animais que vivem em seu ambiente natural (entre os estádios maduro e regressão/esgotado), fato esse que não está ocorrendo nos peixes em cativeiro, nos quais, a diminuição do ovário ocorreu somente cerca de 1,17 vezes. O estágio regressão é comum de se encontrar em animais de cativeiro, principalmente nas espécies que possuem o tipo de desova total, pois os mesmos não conseguem desovar naturalmente.

Segundo Baldisserotto (2002), caso o oócito não seja liberado na desova, ele degenera e é absorvido pelo organismo (oócito atrésico). O número de oócitos que sofrem atresia pode aumentar se a fêmea não estiver em condições ótimas para a reprodução. Além disso, o estresse causado pela manipulação também pode levar à atresia. Isso significa que pode estar ocorrendo alguma disfunção fisiológica devido ao confinamento em que estão sendo submetidos, refletindo assim, uma reabsorção mais lenta de todo o vitelo incorporado no oócito.

No presente estudo, a ocorrência de regressão no ambiente natural também foi observada, mas vale ressaltar, que a quantidade de oócitos atrésicos no interior dos ovários de fêmeas de cativeiro é superior à quantidade desses oócitos nos exemplares de ambiente natural. Provavelmente seja este o motivo do estágio regressão ocorrer em um período mais longo no cativeiro do que no ambiente natural (tabela 05). Aparentemente, estes oócitos demonstram uma reabsorção mais rápida, pois o estágio regressão no ambiente natural ocorre em um período menor se comparado com os animais de cativeiro (tabela 06). Ainda segundo Baldisserotto (2002), em condições naturais, a atresia é muito reduzida, e sua ocorrência pode estar relacionada ao estresse da fêmea.

Os agentes estressores podem afetar algum componente do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e conseqüentemente a reprodução em teleósteos (Mosconi *et al.*, 2006; Norris & Hobbs, 2006). Alguns trabalhos comentam que esses agentes podem atuar no hipotálamo, afetando as funções do GnRH, que resulta na diminuição da síntese de gonadotropinas (Mosconi *et al.*, 2006). Adicionalmente, Norris & Hobbs, (2006) e Foo & Lam, (1993), apresentam que o cortisol afeta a concentração dos esteróides gonadais no plasma de teleósteos, evidenciando que o estresse via ação do cortisol possui efeitos inibitórios sobre os processos reprodutivos em peixes (Mosconi *et al.*, 2006; Norris & Hobbs, 2006).

De certa forma, os valores de IGS apresentaram diferenças significativas entre o estágio repouso com o estágio maduro ou maturação avançada (dependendo do ambiente a ser considerado), independente do grupo experimental, demonstrando assim um bom desenvolvimento das gônadas (tabela 06). Estes dados corroboram os valores de IGS obtidos por Godoy (1975) e Takahashi (2006) para a mesma espécie.

Ainda neste sentido, analisando apenas a variação dos valores de IGS, os dados indicam que o período reprodutivo da tabarana na região do Alto Tietê é entre os meses de outubro a fevereiro. Já Takahashi (2006), relata que o período reprodutivo da tabarana na Região do Baixo Rio Sorocaba/SP é entre os meses de novembro e dezembro e Godoy (1975) comenta que o período reprodutivo da tabarana no Rio Mogi Guaçu é entre os meses de dezembro e janeiro. O período reprodutivo da tabarana na repesa de Três Marias (MG) é durante os meses de outubro a fevereiro (Andrade *et al.*, 2006), corroborando os dados encontrados no presente estudo. Vale ressaltar, que é este o período (outubro a fevereiro) que na região do Alto Tietê ocorre o aumento dos índices pluviométricos, das cheias do rio e das altas temperaturas da água (Amaral, 2005; Amaral, 2006), proporcionando um ambiente com condições ambientais adequadas para a sobrevivência da prole (Sato *et al.*, 2003).

Esse aumento de tamanho dos ovários (macroscópico) ao longo do ciclo reprodutivo e a variação dos valores de IGS decorrente desse aumento, refletem a dinâmica do desenvolvimento ovariano, que nem sempre é possível de se analisar macroscopicamente. Desta maneira, pode-se afirmar que a

análise histológica dos ovários permitiu um diagnóstico correto desse desenvolvimento (somados às características macroscópicas e aos valores de IGS), pois West (1990), Dias *et al.*, (1998) e Honji *et al.*, (2006c), já alertavam sobre os problemas relacionados à identificação do desenvolvimento ovariano apenas com análises macroscópicas. Além disso, no presente trabalho, utilizou-se uma escala simples e com poucas subdivisões desse desenvolvimento. Alguns problemas resultantes de uma classificação macroscópica errônea podem trazer várias consequências para estudos futuros que dependem da avaliação do estado reprodutivo, por exemplo, nas espécies de peixes selvagens que são exploradas comercialmente (Dias *et al.*, 1998; Honji *et al.*, 2006c).

Com isso, a análise microscópica de gônadas apesar de ser mais dispendiosa e demorada, pode descrever de forma detalhada e precisa as informações sobre transições e transformações morfológicas e estruturais que acontecem durante o desenvolvimento gonadal (Dias *et al.*, 1998; Honji *et al.*, 2006c).

De maneira geral, foi observado que o desenvolvimento oocitário da tabarana não difere daquela da maioria das espécies de desova total (sincrônica em grupo). Os oócitos passam por diferentes fases de desenvolvimento, que são descritas a seguir (Wallace & Selman, 1981; Romagosa, 1998; Rocha & Rocha, 2006):

a) estágio de crescimento primário: são observadas principalmente mudanças nucleares, como por exemplo, aumento no tamanho do núcleo e multiplicação dos nucléolos na periferia desse núcleo, além de alterações citoplasmáticas (aumento do tamanho total do oócito), ou seja, ocorre um aumento substancial do tamanho da célula. Adicionalmente, Wallace & Selman (1981), comentam que este crescimento primário é independente da influência dos hormônios adeno-hipofisários;

b) estágio de crescimento secundário: caracterizado pelo crescimento do oócito e são observados vacúolos no citoplasma desses oócitos. Este processo também é conhecido como vitelogênese endógena ou “fase cortical alveolar”. Wallace & Selman (1981) relatam que é nesta fase que surgem as

primeiras estruturas dependentes de gonadotropinas (GtHs), como por exemplo, as vesículas de vitelo (fase cortical alveolar);

c) estágio de crescimento terciário: esta fase é caracterizada pelo rápido aumento de tamanho dos oócitos, devido à vitelogênese exógena. Esse aumento do oócito é atribuído principalmente à deposição de vitelo exógeno por micropinocitose. Este mecanismo é altamente dependente dos hormônios adeno-hipofisários e esteróides gonadais (Nagahama, 1994; Peter & Yu, 1997; Rocha & Rocha, 2006);

d) estágio de crescimento final: observa-se a migração do núcleo em direção à micrópila, a “quebra da vesícula germinal”, coalescência do vitelo e, em algumas espécies (principalmente nas espécies de teleósteos marinhos que desovam oócitos pelágicos), ocorre a hidratação e o aumento de diâmetro dos oócitos. Todo esse processo ocorre depois da estimulação dos hormônios hipofisários (Wallace & Selman, 1981; Rocha & Rocha, 2006).

Associando-se as fases de desenvolvimento oocitário e os estádios de maturação já descritos, observa-se que, na tabarana, as oogônias foram identificadas em todas as fases de desenvolvimento gonadal, como observado na maioria dos peixes teleósteos (Rocha & Rocha, 2006) e, as características morfológicas que foram utilizadas para identificar essas células são: oócitos pequenos com núcleo esférico, volumoso e observou-se apenas um nucléolo com posição central e em alguns oócitos o nucléolo estava levemente excêntrico, além de apresentar citoplasma escasso. Essas características são similares às descritas por Takahashi (2006) para a tabarana na Região do Baixo Rio Sorocaba-SP.

Os oócitos perinucleolares estão presentes também em todas as fases de maturação gonadal, e apresentam características que facilitam a sua identificação no interior dos ovários em análises microscópicas, como já descrito anteriormente nos resultados. Já na próxima fase de desenvolvimento oocitária, os oócitos corticais alveolares, são identificados pela presença de vacúolos que aparecem como estruturas esféricas vazias e são comumente chamadas de vitelo endógeno (Wallace & Selman, 1981; Rocha & Rocha, 2006). É importante comentar a presença de células foliculares ao redor dos oócitos nas fases perinucleolar (mais avançado) e cortical-alveolar, e que estas

células estão diretamente relacionadas com a produção de esteróides gonadais, logo, elas estão diretamente sendo influenciadas pelos hormônios adeno-hipofisários (Wallace & Selman, 1981; Weltzien *et al.*, 2004; Rocha & Rocha, 2006).

Os oócitos vitelogênicos, caracterizados pela deposição de vitelo exógeno no citoplasma, aumentam consideravelmente de tamanho devido a ação da vitelogenina, que é um complexo de glicolipofosfoproteína sintetizada no fígado e transportada via corrente sanguínea para os ovários (Peter & Yu, 1997; Rocha & Rocha, 2006; Yaron & Silvan, 2006). Nesta fase, os oócitos e as camadas foliculares estão sofrendo influência direta das gonadotropinas, liberadas pela adeno-hipófise (Wallace & Selman, 1981; Weltzien *et al.*, 2004; Rocha & Rocha, 2006).

Oócitos maduros no interior dos ovários das tabaranas foram observados apenas no grupo experimental 01 (ambiente natural). Esses oócitos foram caracterizados pela presença da micrópila (figura 10a), além da migração do núcleo (conseqüentemente a “quebra da vesícula germinativa”) e desorganização desse mesmo núcleo (figura 10c).

A estrutura micropilar foi primeiramente descrita por Mark (1890 *apud* Wallace & Selman, 1981), e representa o pólo animal do oócito. A função da micrópila é formar um canal através do córion do oócito para permitir a passagem de um único espermatozóide para posteriormente ocorrer a fertilização e evitar a polispermia (Wallace & Selman, 1981). Além disso, os espermatozóides da maioria dos teleósteos não possuem acrossomo, diferentemente dos outros vertebrados (não-teleósteos), que possuem espermatozóides constituídos por cabeça com acrossomo, peça intermediária e cauda (Nagahama, 1983). A função da cabeça com acrossomo é fundamental para ocorrer o rompimento da membrana do oócito para posterior fusão dos núcleos (vertebrados não-teleósteos). Desta maneira a estrutura micropilar oferece um canal para o espermatozóide penetrar no oócito para posteriormente ocorrer o fusão dos cromossomos (Nagahama, 1983; Kavamoto *et al.*, 1999).

Além dessas fases de desenvolvimento oocitário, foi possível observar outras estruturas decorrentes da maturação gonadal, que são descritas a seguir:

a) Oócitos atrésicos: em várias espécies de peixes teleósteos e em qualquer estágio de desenvolvimento gonadal é comum a presença desses oócitos atrésicos (West, 1990; Honji *et al.*, 2006c; Rocha & Rocha, 2006). Nos ovários da tabarana, os oócitos atrésicos foram observados em todas as fases de desenvolvimento, sendo mais freqüentes nos ovários de animais em ambientes impactados (grupo 02 e 03), entretanto, os oócitos atrésicos também foram encontrados nos ovários de tabarana coletadas no ambiente natural. Este fato é de extrema importância, pois provavelmente as tabaranas da Bacia do Alto Tietê sofrem algum tipo de impacto de origem antrópica (por exemplo, a presença de poluição industrial ou doméstica e reservatórios), que podem comprometer a reprodução e conseqüentemente a sobrevivência dessa espécie e de outros componentes da ictiofauna da região. Além disso, Agostinho *et al.*, (2007) comentam que a construção de reservatórios nos rios (independente de suas finalidades), altera as características hidrológicas à jusante dos reservatórios, além da distribuição natural das vazões no tempo e no espaço, comprometendo assim os aspectos da dinâmica dos rios que são fundamentais para a manutenção das características dos ecossistemas aquáticos, incluindo a ictiofauna e seus habitats.

De uma forma geral, a atresia oocitária nos ovários de teleósteos é mais frequentemente encontradas em fases de desenvolvimento mais avançadas e, envolve a atividade fagocitária dos tecidos ovarianos, ou seja, todas as estruturas presentes dos oócitos são reabsorvidas por processos de autólise ou fagocitose (Vazzoler, 1996; Santos *et al.*, 2005). Os mecanismos que iniciam e regulam a atresia oocitária em teleósteos são pouco conhecidos, especialmente para as espécies neotropicais (Santos *et al.*, 2005).

b) Folículos pós-ovulatórios (FPOs): são estruturas que se formam após a ovulação, ou seja, são formados por células do envelope folicular, que, após a expulsão dos oócitos na fase madura permanecem no interior dos ovários depois da desova. Segundo Drummond *et al.*, (2000) e Romagosa *et*

al., (2005), os FPOs aparentemente não apresentam atividade hormonal em muitos teleósteos investigados e não são homólogos ao corpo lúteo encontrado em mamíferos. Entretanto, Nagahama & Kagawa (1982), estudando a produção de esteróides em FPOs (*in vitro*) de *Oncorhynchus rhodurus*, concluem que os FPOs “jovens” produzem progesterona em resposta à estimulação com gonadotropina de salmão, mas que, os FPOs não sintetizam o 17 β -estradiol. Além disso, Chieffi & Chieffi-Baccari, (1999 *apud* Powell *et al.*, 2006) e Koya *et al.*, (2004) relatam que os FPOs em algumas espécies de teleósteos produzem hormônios esteróides. Desta forma, a habilidade dos FPOs em peixes teleósteos na produção de esteróides gonadais e o verdadeiro papel fisiológico dos mesmos, ainda precisa ser investigado.

De uma forma geral, a morfologia das gônadas, levando em consideração os aspectos macroscópicos e microscópicos, além dos valores de IGS, auxilia na criação de uma escala de maturidade, cuja intenção é auxiliar a compreender o ciclo reprodutivo dos teleósteos, além de subsidiar outros estudos, como por exemplo, comprimento de primeira maturação, ritmos de desova, fecundidade e vários outros trabalhos (Parenti & Grier, 2004). Neste caso, para *S. hilarii*, foi criada uma escala com 4 estádio de desenvolvimento ovariano: repouso, maturação inicial, maduro (ambiente natural) ou maturação avançada (cativeiro) e regressão/esgotado.

No presente trabalho optou-se por agrupar os estádios regressão e esgotado em um único estádio, para posteriormente poder comparar os grupos experimentais, pois, normalmente o estádio esgotado é observado apenas em animais de ambiente natural e o estádio regressão apenas em animais de cativeiro. Entretanto, como mencionado anteriormente, foi observado macroscopicamente o estádio regressão em animais de ambiente natural, indicando que *S. hilarii* está sofrendo algum tipo de impacto que, provavelmente está prejudicando o ciclo reprodutivo desta espécie na Bacia do Alto Rio Tietê.

É importante salientar que apesar de ter sido encontrado os FPOs nos animais de ambiente natural, indicando desova recente, o aspecto geral, microscópico e macroscópico é de um ovário em estádio de regressão, com vários oócitos brancos e de menor tamanho se comparado com o estádio

anterior (maduro) (aspecto macroscópico) e vários oócitos atrésicos (aspecto microscópico), além de alguns FPOs.

O estágio maduro encontrado no ambiente natural, também foi agrupado com o estágio maturação avançada (cativeiro) para posteriormente ser realizada a comparação entre os dois ambientes (ambiente natural e cativeiro). A única diferença observada entre esses estágios de desenvolvimento gonadal foi a presença de oócitos maduros, que é caracterizado pela presença de oócitos vitelogênicos com migração de núcleo em direção à micrópila (estádio maduro) no ambiente natural, e no cativeiro, apenas a presença de oócitos vitelogênicos (maturação avançada).

As análises macroscópicas e microscópicas das gônadas de *S. hilarii*, adicionadas aos valores de IGS, sugerem que o período reprodutivo da tabarana na região do Alto Rio Tietê seja entre os meses de outubro e fevereiro. A tabela 05 mostra que foi capturado no mês de setembro exemplares no estágio maduro, entretanto, nas análises microscópicas não foram observados os folículos pós-ovulatórios, sendo identificados apenas a partir do mês de outubro, indicando o começo do período reprodutivo dos exemplares capturados no presente trabalho. Adicionalmente, são necessárias análises de um número maior de exemplares para confirmar esse início de reprodução.

Além disso, é observado que os animais de cativeiro apresentam um deslocamento (atraso) no desenvolvimento ovariano se comparado aos animais de ambiente natural. A maturação avançada no cativeiro é observada ainda no mês de dezembro (tabela 05) e o estágio regressão permanece até março, indicando esse atraso no desenvolvimento.

5.2.3 – Caracterização do desenvolvimento testicular

Apesar da diversidade de espécies de vertebrados viventes, de acordo com Grier (1993), os testículos dos vertebrados são classificados em 3 tipos, de acordo com a organização do compartimento germinativo, a saber: tubular, tubular anastomosado e lobular. No caso dos testículos tubulares, o compartimento germinativo é formado por túbulos, que não terminam na

periferia do testículo e cujas extremidades estão conectadas a um sistema de ductos (*rete testis*). Esse tipo de testículo (tubular) é encontrado em répteis, aves e mamíferos (amniotas) (Grier, 1993).

No testículo tubular anastomosado, o compartimento germinativo é formado por uma rede intercomunicada por toda a extensão do testículo. Eles se interconectam da periferia até o ducto testicular principal (Grier, 1993). Este tipo de testículo é comum em espécies de teleósteos consideradas como teleósteos “primitivos”, incluindo os peixes mais basais (como os Ostariophysi) (Grier, 1993; Parenti & Grier, 2004). O último tipo observado de testículo é o testículo lobular, que se caracteriza por apresentar o compartimento germinativo em formato digitiforme, ou seja, com fundo cego na periferia do testículo (Grier, 1993; Parenti & Grier, 2004). Esse tipo de testículo é observado em espécies de peixes consideradas mais “derivadas”, isto é, basicamente os peixes classificados como Neoteleostei, por exemplo, os Atheriniformes, Cyprinodontiformes e Synbranchiformes entre outras ordens de teleósteos (Parenti & Grier, 2004). Além disso, os testículos lobulares também são observados em anfíbios.

Apesar do pequeno número de exemplares coletados no presente estudo, foi possível caracterizar o desenvolvimento testicular de *S. hilarii*. Com relação à morfologia do compartimento germinativo, a estrutura testicular de *S. hilarii* é constituída por uma rede de túbulos ramificados e anastomosados que não terminam na periferia testicular em fundo cego. Este tipo de testículo é característico de um testículo tubular anastomosado segundo Grier, (1993) e Parenti & Grier, (2004).

Ainda sobre a classificação dos testículos, Grier (1993) apresenta que a estrutura testicular dos teleósteos pode ser dividida em dois grupos, de acordo com a distribuição das espermatogônias ao longo dos testículos:

⇒ Tipo espermatogonial restrito: as espermatogônias estão confinadas na porção terminal distal dos lóbulos, como observado nos Atheriniformes e Cyprinodontiformes (Parenti & Grier, 2004);

⇒ Tipo espermatogonial irrestrito: as espermatogônias estão distribuídas por toda a extensão dos lóbulos seminíferos, como em Percomorpha (Parenti & Grier, 2004).

O compartimento germinativo dos testículos de *S. hilarii*, apresentou espermatogônias distribuídas por toda a sua extensão, podendo ser classificado como do tipo espermatogonial irrestrito, como a maioria dos peixes teleósteos considerados “primitivos” (Parenti & Grier, 2004).

Na maioria dos teleósteos, ao longo do desenvolvimento gonadal, durante o ciclo reprodutivo, o compartimento germinativo que reveste os túbulos ou lóbulos, apresenta uma série de alterações (Grier & Lo Nostro, 2000; Parenti & Grier, 2004). Estas mudanças no compartimento germinativo são facilmente identificadas com os métodos rotineiros de histologia (Grier, 1993; Grier & Lo Nostro, 2000; Parenti & Grier, 2004). De um modo geral, o epitélio germinativo dos teleósteos tem sido utilizado para descrever os ciclos reprodutivos de várias espécies nacionais, como por exemplo, o *Pseudoplatystoma fasciatum* (Batlouni *et al.*, 2006), *Salminus brasiliensis* (Verísimo-Silveira, 2003), *Serrasalmus spilopleura* e *Pimelodus maculatus* (Nóbrega, 2006), com base na alternância de um epitélio contínuo ou descontínuo e dos estágios que as células germinativas estão presentes nos testículos (Grier & Lo Nostro, 2000; Batlouni *et al.*, 2006; Nóbrega, 2006).

No epitélio germinativo contínuo, uma população constante de células germinativas e de células de Sertoli, está presente ao longo da membrana basal dos túbulos, ou seja, é possível observar a presença de vários cistos ao longo dos túbulos. No interior dos cistos podem ser identificadas as espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides (Brown-Peterson *et al.*, 2002). Já no epitélio germinativo descontínuo, as células germinativas maturam e formam os espermatozóides, que são liberados para o interior dos ductos. No entanto, como as células germinativas, não são repostas à medida que se formam os espermatozóides, ao longo dos ductos é possível observar alguns cistos espaçados entre si, ou seja, os cistos estão dispersos e separados apenas por células de Sertoli (Brown-Peterson *et al.*, 2002).

Para *S. hilarii*, durante o ciclo reprodutivo, não foi possível avaliar as classes reprodutivas e essa alternância de epitélios (contínuo e descontínuo) ao longo do comprimento dos testículos, pois, além do baixo número de exemplares capturados, seria necessária a análise de toda a extensão do lobo

do testículo durante o ciclo reprodutivo. No entanto, os dois tipos de epitélio foram identificados na porção mediana dos testículos, ou seja, o epitélio contínuo e o epitélio descontínuo (respectivamente, figuras 14f e 14e).

De uma forma geral, como o desenvolvimento testicular também altera o tamanho do testículo, consequentemente ocorreu uma alteração na massa corpórea total desses animais. Essa alteração de tamanho é observada também nos valores de IGS, ou seja, conforme o animal torna-se maduro, ocorre um aumento nos valores de IGS, diminuindo no estágio regressão (tabela 05). No entanto devido ao baixo número de animais coletados, não foi possível analisar essa variação ao longo do ciclo reprodutivo da tabarana.

Takahashi (2006) também relata que os maiores valores de IGS para os machos foi encontrado nos animais no estágio maduro. Além disso, é observado que os machos de *S. hilarii* permanecem maduros por um período mais prolongado se comparados com as fêmeas e apresentam valores de IGS menores do que as mesmas. O maior valor de IGS encontrado no presente estudo foi no estágio maduro e as análises histológicas dos testículos mostraram que os mesmos apresentam um epitélio germinativo descontínuo e que estavam no estágio maduro.

5.3 – Caracterização das células adeno-hipofisárias de *Salminus hilarii*

A hipófise de *S. hilarii* é uma glândula e se localiza na base do diencéfalo e estabelece uma relação anatômica e funcional com o hipotálamo através de um pedúnculo hipofisário. Essa glândula compõe-se de dois tipos de tecidos com diferentes origens, a adeno-hipófise (tecido glandular endócrino) e a neuro-hipófise (origem nervosa) (Weltzien *et al.*, 2004). As células adeno-hipofisárias têm sido caracterizadas em várias espécies de teleósteos, utilizando-se técnicas de histoquímicas e de imuno-histoquímicas com anticorpos altamente purificados (Segura-Noguera *et al.*, 2000; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2001; Pandolfi *et al.*, 2001a; Pandolfi *et al.*, 2001b; Laiz-Carrión *et al.*, 2003; Cala *et al.*, 2003; Agulleiro *et al.*, 2006; Borella *et al.*, 2006; Antoneli, 2006; Cinquetti & Dramis, 2006).

De um modo geral, a neuro-hipófise é constituída pela “*pars nervosa*” que penetra e se ramifica no interior da adeno-hipófise (Weltzien *et al.*, 2004). Já a adeno-hipófise é subdividida em “*rostral pars distalis*” (RPD), “*proximal pars distalis*” (PPD) e “*pars intermedia*” (PI), de acordo com as características tintoriais de suas células produtoras de hormônios (Weltzien *et al.*, 2004; Kawauchi & Sower, 2006). Em *S. hilarii*, a hipófise foi processada sem orientação espacial como nos outros trabalhos, pois, no momento da coleta da hipófise, o pedúnculo hipofisário era rompido. Mesmo assim, foi possível identificar as três regiões adeno-hipofisárias (RPD, PPD e PI) na tabarana. Essas análises sugerem que a distribuição dessas regiões em *S. hilarii*, é semelhante à encontrada para a maioria dos teleósteos, ou seja, a região da PI localiza-se na porção mais caudal ou posterior da glândula e nesta, são observadas a maior parte das ramificações da neuro-hipófise. A RPD localiza-se na porção anterior da glândula e envolve o pedúnculo hipofisário, e a PPD é a maior parte da adeno-hipofisária e encontra-se entre a RPD e PI (Pandolfi *et al.*, 2001a; Cala *et al.*, 2003; Weltzien *et al.*, 2004; Agulleiro *et al.*, 2006; Takei & Loretz, 2006).

Considerando-se apenas a porção glandular, segundo Kawauchi & Sower (2006), a adeno-hipófise é uma glândula que secreta uma série de hormônios que regulam uma variedade de processos fisiológicos em teleósteos, sendo que, os hormônios adeno-hipofisários podem ser agrupados conforme sua similaridade estrutural e funcional em 3 famílias: a família derivada de proopiomelanocortina, que abrange a adrenocorticotropina (ACTH) e a melanotropina (MSH); a família prolactina/somatotropina, que inclui prolactina (PRL), hormônio de crescimento (GH) e somatolactina (SL); e a família dos hormônios glicoprotéicos, que contém gonadotropinas (GtH) e tireotropina (TSH) (Agulleiro *et al.*, 2006; Takei & Loretz, 2006; Kawauchi & Sower, 2006).

Geralmente, em teleósteos, as células produtoras de prolactina e adrenocorticotropina preferencialmente encontram-se na RPD. As células produtoras de gonadotropinas situam-se principalmente na PPD, assim como as células produtoras de hormônio de crescimento e tireotropina que também se situam na região da PPD. A PI que se localiza na região mais próxima das ramificações da neuro-hipófise, como mencionado anteriormente, é encontrada

preferencialmente as células que sintetizam e secretam a somatolactina e hormônio estimulante de melanotropina (Pandolfi *et al.*, 2001a; Cala *et al.*, 2003; Weltzien *et al.*, 2004; Agulleiro *et al.*, 2006; Takai & Loretz, 2006).

É importante salientar, que todos esses hormônios, exceto a somatolactina, estão presentes nos outros vertebrados (Ono *et al.*, 1990; Kaneko, 1996). Em algumas espécies de teleósteos, duas formas de GtHs e/ou duas células gonadotrópicas têm sido registrado (Kawauchi *et al.*, 1989; Garcia-Hernández *et al.*, 1997; Swanson *et al.*, 2003; Weltzien *et al.*, 2004). Entretanto, no “catfish” africano foi observada apenas uma GtH (Koide *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1995; Agulleiro *et al.*, 2006), assim como foi encontrado apenas uma GtH na lampréia (Agnata – Petromyzontiformes) (Sower *et al.*, 2006).

No presente trabalho, a adeno-hipófise e a distribuição das células adeno-hipofisárias em *S. hilarii*, foi similar ao descrito acima para outras espécies de teleósteos.

5.3.1 – Família derivada de proopiomelanocortina: adrenocorticotropina e a melanotropina

Proopiomelanocortina (POMC) é um precursor protéico de vários hormônios, como por exemplo, a adrenocorticotropina (ACTH), melanotropina (MSH) e β -endorfina (Kawauchi & Sower, 2006). O papel fisiológico de ACTH é estimular a síntese e liberação de cortisol no tecido inter-renal de teleósteos (Segura-Noguera *et al.*, 2000). Em teleósteos o cortisol, atua em vários processos fisiológicos, como por exemplo, no metabolismo, nas reações ao estresse e na osmorregulação (Segura-Noguera *et al.*, 2000; Kawauchi & Sower, 2006).

Em relação ao MSH, o papel fisiológico desse hormônio em teleósteos é estimular a dispersão dos grânulos de pigmentos nos melanócitos, produzindo assim uma rápida mudança de coloração no peixe (Cala *et al.*, 2003; Kawauchi & Sower, 2006).

Em *S. hilarii*, apesar de não ter sido realizada nenhuma reação de imuno-histoquímica com anticorpos para MSH e ACTH para identificar as

células produtoras destes hormônios, foi possível através de técnicas histoquímicas identificar estas células na adeno-hipófise.

As células produtoras de ACTH em *S. hilarii*, localizam-se na RPD e estão dispostas em cordões ao redor dos ramos de neuro-hipófise, algumas células de ACTH, no entanto, encontra-se também entre as células PRL e a neuro-hipófise nessa mesma região (RPD). Esse padrão de distribuição foi observado em várias espécies de teleósteos, como por exemplo, *Diplodus sargus* (Segura-Noguera *et al.*, 2000), *Trachinus draco* (Cala *et al.*, 2003), *Seriola dumerilli* (Garcia-Hernández *et al.*, 1996), entre outras espécies. Entretanto, Borella *et al.*, (2006) mostram que as células produtoras de ACTH em *Arapaima gigas* não estão diretamente associadas aos ramos da neuro-hipófise, mas ao redor de vasos sanguíneos situados entre os cordões celulares da *pars distalis*.

Para as espécies nacionais, trabalhos que identificaram as células ACTH são escassos, sendo estudadas em *Piaractus mesopotamicus* (Borella *et al.*, 1997), *Arapaima gigas* (Borella *et al.*, 2003a; Borella *et al.*, 2006), *Pseudoplatystoma fasciatum* (Beolchi *et al.*, 2003), *Osteoglossum bicirrhosum* (Borella *et al.*, 2003b; Borella *et al.*, 2006) e *Synbranchus marmoratus* (Antoneli, 2006).

As células produtoras de MSH em *S. hilarii* foram identificadas na região da PI e estão em arranjo cordonal, próximos aos ramos da neuro-hipófise. Em várias espécies de teleósteos foram estudadas e identificadas as células produtoras de MSH também na PI (Garcia-Hernández *et al.*, 1996; Segura-Noguera *et al.*, 2000; Kawauchi & Sower, 2006).

É importante salientar, que em várias espécies de peixes investigadas, os anticorpos utilizados (geralmente anticorpos de mamíferos) não conseguem distinguir as células corticotrópicas das melanotrópicas nos teleósteos, ou seja, em várias espécies de peixes, ao utilizar o anticorpo para ACTH (de mamífero), ocorre uma reação cruzada com as células produtoras de MSH (Garcia-Hernández *et al.*, 1996; Segura-Noguera *et al.*, 2000; Borella *et al.*, 2006), com exceção de *Barbus barbus*, espécie em que não foi observada essa reação cruzada (Toubeau *et al.*, 1991).

Em relação às espécies nacionais, as células MSH, assim como as células ACTH foram estudadas em poucas espécies, como supracitado. Além

disso, o uso de diferentes desenhos experimentais para estimular as células produtoras de ACTH e de MSH em *S. hilarii*, são necessários para poder entender o papel fisiológico desses hormônios.

5.3.2 – Família prolactina/somatotropina: prolactina, hormônio de crescimento e somatolactina

As células produtoras de prolactina (PRL), hormônio de crescimento (GH) e somatolactina (SL) formam uma família de hormônios adeno-hipofisários, que são similares na sua estrutura, função e organização gênica (Kawauchi & Sower, 2006).

No presente estudo, foi utilizado o anti-PRL de *chum salmon* (*Oncorhynchus keta*), que apresentou uma reação positiva com as células produtoras de PRL em *S. hilarii*. Esta reação positiva como visto em *S. hilarii*, foi observada em várias espécies de teleósteos de clima temperado (García-Ayala *et al.*, 1997; Segura-Noguera *et al.*, 2000; Pandolfi *et al.*, 2001a; Cala *et al.*, 2003).

As células PRL em *S. hilarii* localizam-se apenas na RPD como na maioria dos teleósteos e foi a principal célula nesta região. No entanto, em *Seriola dumerilii* (Garcia-Hernández *et al.*, 1996), as células PRL, além de localizarem-se na RPD, também foram observadas algumas células na PPD. Já em *Sparus aurata* essas células foram escassas na região da RPD (Quesada *et al.*, 1988). Ainda neste sentido, Toubreau *et al.*, (1991), identificaram células de PRL na “*pars intermedia*”, na “*proximal pars distalis*” e na “*rostral pars distalis*” em *Barbus barbus*. A distribuição de algumas células produtoras de PRL na região da PPD e PI pode ser devido à migração dessas células para essas regiões durante os períodos iniciais do desenvolvimento da hipófise (Laiz-Carrión *et al.*, 2003; Borella *et al.*, 2006).

Em *S. hilarii*, ao utilizar o anti-PRL de *chum salmon*, não foi observada nenhuma reação cruzada com as células produtoras de GH, entretanto, em outras espécies de teleósteos investigadas, foi demonstrada uma reação cruzada entre as células produtoras de PRL com as células de GH (Farbridge & Leatherland, 1986; Garcia-Hernández *et al.*, 1996; Pandolfi *et al.*, 2001b).

Sabe-se ainda, que o papel fisiológico da PRL em teleósteos, está relacionado principalmente com a osmorregulação (Segura-Noguera *et al.*, 2000; Forsyth & Wallis, 2002; Cala *et al.*, 2003; Kawauchi & Sower, 2006; Mancera & Fuentes, 2006). Adicionalmente, alguns estudos indicam que a PRL esteja envolvida também na reprodução e nas reações ao estresse (Cala *et al.*, 2003). Para as espécies nacionais, os estudos sobre as células produtoras de PRL ainda são escassos e poucas espécies foram investigadas (Borella *et al.*, 1997; Borella *et al.*, 2003a; Borella *et al.*, 2003b; Beolchi *et al.*, 2003; Borella *et al.*, 2006; Antoneli, 2006).

As células produtoras de GH tem um papel fundamental na regulação do crescimento e desenvolvimento em teleósteos, além de estar envolvido em outros processos fisiológicos, como por exemplo, osmorregulação, reprodução e metabolismo (Segura-Noguera *et al.*, 2000; Forsyth & Wallis, 2002; Cala *et al.*, 2003; Kawauchi & Sower, 2006; Agulleiro *et al.*, 2006). Entretanto, a maioria dessas funções descritas acima para o GH, são exercidas via sistema IGF (do inglês, “*insulin-like growth factor*” – fator de crescimento semelhante à insulina) (Agulleiro *et al.*, 2006).

Na adeno-hipófise de *S. hilarii*, utilizando-se anti-GH de *chum salmon* (*Oncorhynchus keta*), foram identificadas células produtoras de GH distribuídas apenas na região da PPD. Esse perfil de distribuição dessas células na PPD é observado em várias espécies de teleósteos, como por exemplo, em *Barbus barbus* (Toubeau *et al.*, 1991), *Seriola dumerilii* (García-Ayala *et al.*, 1997), *Odontesthes bonariensis* (Vissio *et al.*, 1997), *Trachinus traco* (Cala *et al.*, 2003), *Diplodus sargus* (Segura-Noguera *et al.*, 2000), inclusive para algumas espécies nacionais (Borella *et al.*, 1997; Borella *et al.*, 2003a; Borella *et al.*, 2003b; Beolchi *et al.*, 2003; Borella *et al.*, 2006; Antoneli, 2006).

Como mencionado anteriormente, na adeno-hipófise da tabarana, não foi observada reação cruzada entre as células produtoras de GH com as células produtoras de PRL, no entanto, em outras espécies de teleósteos, essa reação cruzada foi observada (Farbridge & Leatherland, 1986; Garcia-Hernández *et al.*, 1996; Pandolfi *et al.*, 2001b).

Em geral, as células produtoras de GH em *S. hilarii*, foram facilmente reconhecidas com o método de imuno-histoquímica, além de serem bastante numerosas na região da PPD. No entanto, Borella *et al.*, (2006) estudando as

células de GH em *Arapaima gigas*, comentam que estas células não são facilmente reconhecidas, ou por serem pouco numerosas, ou talvez pela falta de maior especificidade do anticorpo utilizado. Vale ressaltar que o *Arapaima gigas* é considerado evolutivamente como um “teleósteo primitivo” e a distribuição das células adeno-hipofisárias apresenta diferenças com as células de outras espécies de peixes consideradas mais “derivadas” (Borella *et al.*, 2006).

As células produtoras de somatolactina (SL), também conhecidas como *PIPAS-cells*, foram primeiramente descritas por Ono *et al.*, (1990) e Rand-Weaver *et al.*, (1991a) e até o momento este hormônio só foi encontrado em peixes (Kaneko, 1996; Kawauchi & Sower, 2006).

Na tabarana, as células produtoras de SL foram identificadas na região da “*pars intermedia*” e estão distribuídas ao redor dos ramos da neuro-hipófise. Essa distribuição é similar à encontrada para outras espécies de peixes, além disso, são células abundantes na PI e foi observada uma forte reação com anti-SL de *chum salmon* (*Oncorhynchus keta*).

As células produtoras de SL são PAS positivas em *S. hilarii*, entretanto, em algumas espécies não foi observada esta reação positiva com PAS, sendo PAS negativas. Entre esses teleósteos podemos citar, *Piaractus mesopotamicus* (Borella *et al.*, 1997), *Diplodus sargus* (Segura-Noguera *et al.*, 2000), *Arapaima gigas* (Borella *et al.*, 2006), *Osteoglossum bicirrhosum* (Borella *et al.*, 2006), entre outras espécies. É importante comentar, que alguns estudos indicam que existem dois tipos de SL: a forma SL glicosilada e a forma SL não-glicosilada (Garcia-Hernández *et al.*, 1996; Kaneko, 1996; Rendon *et al.*, 1997; Segura-Noguera *et al.*, 2000; Cala *et al.*, 2003; Laiz-Carrión *et al.*, 2003). Neste caso, em várias espécies de peixes não-salmonídeos, foi observada a reação PAS positiva devido à forma glicosilada da SL na região da PI (Kaneko, 1996; Rendon *et al.*, 1997; Segura-Noguera *et al.*, 2000; Cala *et al.*, 2003), entretanto, em salmonídeos (Rand-Weaver *et al.*, 1991b; Kaneko, 1996), *Osteoglossum bicirrhosum* e *Arapaima gigas* (Borella *et al.*, 2006) a forma encontrada pode ser a do tipo não-glicosilada e conseqüentemente a reação PAS é negativa. Adicionalmente, em *Sparus aurata* (Cavari *et al.*, 1995) foram identificadas as duas formas de SL (glicosilada e não-glicosilada), resultando em ambas as reações (PAS positiva e PAS negativa). Em *S. hilarii*,

como foi observada a reação PAS positiva como mencionado acima, a forma da SL presente é a do tipo glicosilada. No entanto, são necessários mais estudos para saber se existe a forma não glicosilada na adeno-hipófise da tabarana.

Em *S. hilarii*, não foi observada nenhuma reação cruzada das células produtoras de SL com as células GH e PRL, como observado em outros teleósteos (Garcia-Hernández *et al.*, 1996), entretanto, foi constatada uma reação cruzada com as células gonadotrópicas (figura 18e).

O hormônio SL como supracitado foi descoberto recentemente (em relação aos outros hormônios adeno-hipofisários) (Ono *et al.*, 1990; Rand-Weaver *et al.*, 1991a), no entanto, o verdadeiro papel fisiológico da SL em peixes, ainda continua desconhecido. Algumas evidências indicam que a SL esteja envolvida em vários processos fisiológicos, como por exemplo: no metabolismo, na regulação ácido-básica e osmorregulação (Kakizawa *et al.*, 1993; Kakizawa *et al.*, 1995a; Kaneko, 1996), no desenvolvimento embriológico (Laiz-Carrión *et al.*, 2003), no estresse (Rand-Weaver *et al.*, 1993; Kaneko, 1996), na reprodução (Olivereau & Rand-Weaver, 1994; Kaneko, 1996; Vissio *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1997; Mousa & Mousa, 2000) e na produção de esteróides sexuais (Planas *et al.*, 1992; Mayer *et al.*, 1998).

Para as espécies nacionais, poucos estudos têm sido realizados para identificar as células produtoras de SL, sendo identificadas em: *Arapaima gigas* (Borella *et al.*, 2006), *Osteoglossum bicirrhosum* (Borella *et al.*, 2006), *Pseudoplatystoma fasciatum* (Beolchi *et al.*, 2003) e *Synbranchus marmoratus* (Antoneli, 2006).

De um modo geral, as células produtoras de PRL, GH e SL em *S. hilarii* durante o ciclo reprodutivo, serão discutidas a seguir.

5.3.3 – Variações das células da Família prolactina/somatotropina durante o ciclo reprodutivo em *Salminus hilarii*

Os hormônios da família prolactina/somatotropina (hormônio de crescimento, prolactina e somatolactina), foram analisados qualitativamente e quantitativamente em relação ao ciclo reprodutivo de *S. hilarii*.

As células produtoras de prolactina (PRL) na tabarana, não apresentaram variações durante o ciclo reprodutivo e nem entre os grupos experimentais (análise qualitativa). Tal fato pode ser explicado devido aos resultados obtidos por outros estudos em teleósteos, que indicam que a PRL está diretamente relacionada com a osmorregulação em peixes (Forsyth & Wallis, 2002; Sakamoto & McCormick, 2006; Mancera & Fuentes, 2006). Como a PRL está envolvida na regulação iônica em espécies de teleósteos que habitam água doce e em espécies eurihalinas, ou ainda, naquelas espécies que migram (Sakamoto & McCormick, 2006; Mancera & Fuentes, 2006), esses dados podem indicar que a tabarana ao migrar para se reproduzir, não enfrenta alterações na composição iônica na água do Rio Tietê. Entretanto, são necessários mais estudos sobre as células PRL em *S. hilarii*, além de abordagens junto à qualidade da água dos Rios que esta espécie habita.

O hormônio de crescimento em teleósteos vem sendo intensamente pesquisado nos últimos anos (Canosa *et al.*, 2007) e está claro o papel fisiológico deste hormônio no crescimento somático e no desenvolvimento em peixes (Blázquez *et al.*, 1998; Canosa *et al.*, 2007). Além dessas funções fisiológicas supracitadas, o GH está envolvido no metabolismo, na reprodução, na osmorregulação, entre outras funções (Björnsson, 1997; Mommsen, 2001; Hull & Harvey, 2002; Canosa *et al.*, 2007).

De uma forma geral, o hormônio de crescimento está envolvido diretamente na reprodução, pois, o crescimento do organismo, primeira maturação gonadal, desenvolvimento das gônadas e conseqüentemente na manutenção do animal, requerem um controle no crescimento somático desse organismo, e este crescimento é controlado por um sistema neuroendócrino que envolve o GH (Björnsson, 1997; Mommsen, 2001; Hull & Harvey, 2002; Canosa *et al.*, 2007).

Em relação às possíveis variações das células produtoras de GH em *S. hilarii* durante o ciclo reprodutivo, foi observado que estas células possuem uma maior porcentagem de imunomarcagem quando os animais estão no estágio repouso, diminuindo com o avanço da maturação gonadal. O termo “repouso” é de certo modo incorreto de ser usado, e tem sido duramente criticado pelos pesquisadores, pois, apesar de não apresentar variações no tamanho das gônadas neste estágio, o órgão não está em repouso, uma vez

que os epitélios gonadais estão em intensa atividade de síntese, preparando-se para “repovoar” as gônadas e retomar o processo de divisão celular (Brown-Peterson *et al.*, 2002; Batlouni, 2004). Neste caso, como o GH está envolvido no crescimento somático e no desenvolvimento celular (Björnsson, 1997; Mommsen, 2001; Hull & Harvey, 2002; Canosa *et al.*, 2007), é de se esperar que a atividade das células produtoras de GH esteja intensa neste estágio de desenvolvimento, provavelmente seja este o motivo de se obter uma maior imunomarcagem neste estágio.

Em fêmeas, com o avanço da maturação gonadal, como foi discutido anteriormente, o aumento do tamanho dos oócitos é devido principalmente a incorporação de vitelogenina e não devido à proliferação celular. Entretanto, no fígado (local de produção de vitelogenina) ocorre intensa atividade sintética com o avanço da maturação, sendo necessários estudos futuros sobre a ação do GH neste órgão. É importante salientar, que outros tecidos como o fígado e as brânquias (em teleósteos), possuem elevada taxa de síntese de proteínas, no entanto, são órgãos em que se observa também uma alta taxa de degradação protéica (Houlihan *et al.*, 1995 *apud* Mommsen, 2001).

Não foi possível analisar essa variação das células de GH em machos de *S. hilarii*, devido ao baixo número de exemplares capturados. No entanto, Batlouni (2004), comenta que no estágio repouso, as espermatogônias estão em intensa atividade de síntese, preparando-se para “repovoar” os testículos e provavelmente nesta fase a ação do GH esteja intensa. Além disso, Le Gac *et al.*, (1992) apontam evidências de ligação e ação do hormônio de crescimento em testículos de truta.

De uma forma geral, no estágio maturação inicial e maturação avançada em *S. hilarii*, as porcentagens da imunomarcagem são elevadas se comparados ao estágio regressão/esgotado (tabela 08), sendo os estágios maturação inicial e maturação avançada as fases em que se observa o maior aumento do diâmetro do oócito, indicando uma maior atividade do GH. Sabe-se ainda, que a maturação gonadal está sob influência das gonadotropinas e estas influenciam a produção dos esteróides gonadais. Neste sentido, em teleósteos, a relação entre a concentração plasmática de esteróides e a taxa de crescimento ainda permanece incerta (Le Gac *et al.*, 1993). No entanto, esses mesmos autores, comentam que em salmonídeos os baixos níveis de

andrógenos circulantes estão relacionados ao rápido crescimento e quando a concentração de andrógenos é alto (ou quando aumenta rapidamente) coincide com uma baixa taxa de crescimento. Além disso, esses autores supracitados relatam que mesmo em níveis baixos, os andrógenos possuem um potente efeito promotor de crescimento.

Entre os hormônios hipofisários observados em teleósteos, a somatolactina é o único hormônio encontrado somente em peixes (Kaneko, 1996; Kawauchi & Sower, 2006) e o seu significado fisiológico continua pouco compreendido. Levando-se em consideração apenas os aspectos reprodutivos, as possíveis funções da somatolactina são apresentadas abaixo.

Rand-Weaver *et al.*, (1992 *apud* Kaneko, 1996) comentam que a concentração plasmática de SL em salmonídeos aumenta com o desenvolvimento gonadal e foi correlacionada também com as altas concentrações plasmáticas de estradiol em fêmeas e 11-cetotestosterona em machos. Portanto, tem sido sugerido que a SL regula alguns aspectos fisiológicos na reprodução. Além disso, Rand-Weaver *et al.*, (1993 *apud* Kaneko, 1996), relatam que as concentrações plasmáticas de SL em *coho salmon* se alteram durante a maturação sexual, alcançando um pico elevado na desova.

Adicionalmente, Planas *et al.*, (1992), demonstram que SL estimula a produção *in vitro* de 11-cetotestosterona e testosterona em fragmentos de testículos e a produção de estradiol pelos folículos ovarianos são de maneira dose-dependente. Mayer *et al.*, (1998) mostram também que em *Salmo salar*, quando os animais são gonadectomizado, ocorre uma redução dos níveis plasmáticos de SL, indicando a correlação entre SL e os esteróides gonadais. No entanto, Planas *et al.*, (1992), comentam que esta atividade esteroidogênica é mínima e menos potente se comparado com a estimulação das gonadotropinas.

O aumento na liberação de SL pode indicar que este hormônio tem ação hipercalcêmica, semelhante a outros hormônios que estão envolvidos na homeostase de cálcio (hipocalcina, calcitonina, entre outros) em teleósteos (Kakizawa *et al.*, 1993; Kakizawa *et al.*, 1995a). Corroborando o fato de que, durante o período de produção de vitelogenina, a demanda de cálcio no fígado e nos ovários aumentam (Mousa & Mousa 2000). Esse resultado pode sugerir

que a SL esteja envolvida indiretamente na reprodução e diretamente com o metabolismo do cálcio durante o ciclo reprodutivo.

Por outro lado, Kakizawa *et al.*, (1995b) reportam que não está clara a correlação entre os níveis plasmáticos de SL e a maturação gonadal em *chum salmon*, pois esses autores observaram que a concentração plasmática de SL em *chum salmon* (maduros) capturados no oceano, na baía e no rio durante a migração, aumentam significativamente quando os animais migram do oceano para o rio. Entretanto, não necessariamente esse aumento esteja relacionado com o desenvolvimento gonadal, pois, tem sido observado que a SL esteja envolvida no metabolismo energético e/ou na homeostase do cálcio durante a migração de *chum salmon* e, além disso, a concentração plasmática de SL em peixes salmonídeos, eleva-se em resposta ao estresse (Rand-Weaver *et al.*, 1993; Kakizawa *et al.*, 1993; Kakizawa *et al.*, 1995b).

Adicionalmente, em *Mugil cephalus*, Mousa & Mousa, (2000), apresentam que a atividade das células produtoras de SL na “*pars intermedia*” aumenta durante a maturação e desova, como também foi observado para *Oncorhynchus nerka* e *Oncorhynchus keta* (Olivereau & Rand-Weaver, 1994), *Oreochromis niloticus* (Mousa & Mousa, 1999) e *Odontesthes bonariensis* (Vissio *et al.*, 1997). Esses resultados indicam que a SL esteja envolvido na reprodução.

Levando-se em consideração esses trabalhos supracitados, podemos sugerir que o aumento da porcentagem de imunomarcção de SL em *S. hilarii* com o avanço do desenvolvimento gonadal pode indicar o envolvimento da somatolactina no ciclo reprodutivo anual da tabarana e possivelmente na homeostase do cálcio. Ao analisar a tabela 09, observa-se que no estágio maturação avançada (cativeiro) e maduro (no ambiente natural), a imunomarcção é maior, indicando que as células são frequentemente mais granulada, sugerindo alta atividade sintética de SL. Após esta fase, no estágio regressão/esgotado, é observada uma queda nesta imunomarcção, indicando que as células SL estão degranuladas, sugerindo uma atividade de liberação de SL durante a desova. Esses resultados também foram observados por Mousa & Mousa (2000).

No entanto, ainda não está claro, se a SL em *S. hilarii* está diretamente relacionado com a reprodução, pois a tabarana é uma espécie reofílica e

necessita migrar para se reproduzir e esse animal não é uma espécie diádroma (anádromo ou catádromo) como a maioria das espécies de salmões, nas quais provavelmente a SL esteja envolvida também na osmorregulação (Kakizawa *et al.*, 1993; Kakizawa *et al.*, 1995a; Kaneko, 1996). Além disso, a migração dos salmões supera em muitos quilômetros a distância percorrida pela tabarana, supondo-se também que a variação de SL esteja correlacionada com o metabolismo como mencionado anteriormente (Kakizawa *et al.*, 1993; Kakizawa *et al.*, 1995a).

Vale lembrar que a prolactina está diretamente relacionada com a osmorregulação em teleósteos (Sakamoto & McCormick, 2006; Mancera & Fuentes, 2006), e em espécies diádrumas as células que produzem este hormônio (PRL) possuem elevada atividade sintética e que possivelmente variam durante essa migração. Além disso, deve-se considerar que existem outros hormônios relacionados com a osmorregulação, como por exemplo, a arginina-vasotocina, hormônio de crescimento, somatolactina entre outros (Mancera & Fuentes, 2006).

Na tabarana, não foram observados variações das células produtoras de PRL, o que, provavelmente, indica que a tabarana não sofre grandes alterações osmóticas na sua migração. Logo, esses resultados reforçam ainda mais o fato de que a variação de SL na tabarana pode estar correlacionada com a reprodução como observado em outros teleósteos (Olivereau & Rand-Weaver, 1994; Johnson *et al.*, 1997; Mousa & Mousa, 1999; Mousa & Mousa, 2000; Vissio *et al.*, 1997). Entretanto, a variação da SL pode também estar relacionada com o metabolismo na tabarana, pois, Camargo (2007), observou alterações nos parâmetros metabólicos durante o ciclo reprodutivo nestes mesmos animais.

É importante salientar que no presente trabalho não foi quantificada a concentração de cálcio no plasma dos animais e nem na água dos grupos experimentais para poder estabelecer estas relações entre a somatolactina e o cálcio.

Ao comparar os grupos experimentais, foi observado, que a imunomarcção foi maior no cativeiro do que no ambiente natural, esse resultado é similar ao encontrado por Mousa & Mousa (2000) para *Mugil cephalus*. Esse aumento na imunomarcção durante o ciclo reprodutivo e entre

os grupos experimentais, pode ser devido ao aumento do estresse (como sugerido por Rand-Weaver *et al.*, 1993), e à variação da concentração de cálcio (como sugerido por Kakizawa *et al.*, 1993).

Em resumo, os resultados apresentados para SL, sugerem uma relação positiva entre SL e a atividade reprodutiva, mas as análises não permitem atribuir essa definitiva função deste hormônio em *S. hilarii*. Essa variação de SL possivelmente pode ser responsável pela regulação dos processos associados que indiretamente afetam a reprodução, semelhante a esteroidogênese, metabolismo de cálcio, osmorregulação e mobilização energética. Muitos estudos sobre a variação das células adeno-hipofisárias precisam ser realizadas para compreender os mecanismos de ação, variação na síntese e liberação dos hormônios e o papel fisiológico dos mesmos durante o ciclo reprodutivo. Além disso, outras investigações comparando a variação desse perfil hormonal entre o ambiente natural e ambiente de cativeiro precisam ser realizadas.

5.3.4 – Família dos hormônios glicoprotéicos: tireotropina e gonadotropinas

A família dos hormônios glicoprotéicos inclui o hormônio liberador de tireotropina (TSH), o hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), esses dois últimos são conhecidos também como gonadotropinas (GtHs) (Kawauchi & Sower, 2006). Esses hormônios glicoprotéicos consistem de duas subunidades distintas, a α e a β . A subunidade α é comum aos três hormônios supracitados e a subunidade β é específica para cada hormônio, conferindo a especificidade do mesmo (Kawauchi *et al.*, 1989; Weltzien *et al.*, 2004; Kawauchi & Sower, 2006).

As células produtoras de TSH têm sido identificadas em várias espécies de teleósteos (García-Ayala *et al.*, 1998; Segura-Noguera *et al.*, 2000; Cala *et al.*, 2003), no entanto, a disponibilidade de anticorpos da subunidade β de teleósteos ainda é restrita, sendo caracterizada em poucas espécies (Kawauchi & Sower, 2006). Usualmente, o anticorpo contra TSH de humanos (subunidade β) tem sido utilizado em teleósteo e o mesmo apresenta-se como

um bom anticorpo para identificar as TSH em peixes (Garcia-Hernandez *et al.*, 1996; Segura-Noguera *et al.*, 2000; Cala *et al.*, 2003). Entretanto, em algumas espécies de teleósteos, é sugerido que o anti-TSH de mamífero não fornece uma identificação clara das respectivas células TSH (Cinquetti & Dramis, 2006). É importante salientar que, devido à similaridade na subunidade α nos três hormônios, em algumas espécies de teleósteos é observada uma reação cruzada ao utilizar o anticorpo de humanos com as células GtHs (Yan & Thomas, 1991; Kawauchi & Sower, 2006).

Devido a indisponibilidade de anticorpos tanto de teleósteos como o de mamíferos, não foi possível identificar as células produtoras de TSH em *S. hilarii*. Procuraram-se outras metodologias para identificar essas células, no entanto, não foi possível caracterizá-las no presente estudo.

Na literatura é possível encontrar alguns trabalhos que investigaram o papel fisiológico do TSH em teleósteos. O TSH pode estar envolvido na metamorfose em Pleuronectiformes (Schreiber & Specker, 1999), no desenvolvimento ontogenético (larval) (Laiz-Carrión *et al.*, 2003) e indiretamente na reprodução, pois, foi observado que o hormônio tireoidiano (T_3) intensifica o efeito estimulatório do GnRH em *Salmo trutta* (Mylonas *et al.*, 1994) e em outros trabalhos sugerem que os hormônios tireoidianos agem sinergisticamente com as gonadotropinas (Sullivan *et al.*, 1989 *apud* Mylonas *et al.*, 1994). Além desses estudos, é possível encontrar trabalhos que identificaram e caracterizaram as células TSH em peixes, no entanto, é necessário um maior investimento em trabalhos que buscam saber qual o verdadeiro papel fisiológico do TSH em peixes (Mylonas *et al.*, 1994; García-Ayala *et al.*, 1998; Segura-Noguera *et al.*, 2000; Cala *et al.*, 2003; Laiz-Carrión *et al.*, 2003; Kawauchi & Sower, 2006).

As células gonadotrópicas (GtHs), são as células mais estudadas na adeno-hipófise de teleósteos. Em *S. hilarii*, as GtHs são globosas, PAS positivas (possuem polissacarídeos neutros e ácidos), com núcleo excêntrico e citoplasma basófilo. Apresentam vacúolos no citoplasma, que podem variar de acordo com o ciclo reprodutivo, e estão distribuídas em toda a região da “proximal pars distalis”. Esse padrão de distribuição celular na PPD e as características morfológicas e tintoriais apresentadas também são compartilhadas por outros teleósteos (García-Ayala *et al.*, 1998; Segura-

Noguera *et al.*, 2000; Cala *et al.*, 2003; Laiz-Carrión *et al.*, 2003; Weltzien *et al.*, 2004; Kawauchi & Sower, 2006). Em algumas espécies foram observadas células GtHs na “*pars intermedia*” e ao redor dessa região (Cambré *et al.*, 1986; Quesada *et al.*, 1988; Yan & Thomas, 1991; Vissio *et al.*, 1997; Segura-Noguera *et al.*, 2000; Nóbrega, 2006). Cambré *et al.*, (1986), consideram que essa distribuição das GtHs na PI seja devido a projeções da PPD no interior da PI.

Parreira (1998) estudou as células GtHs através de microscopia eletrônica de transmissão, e revelou que as células GtHs apresentam citoplasma com complexo de Golgi bem desenvolvido e cisternas dilatadas do retículo endoplasmático rugoso, além de possuírem grânulos elétron-densos. Na microscopia de luz são encontrados vacúolos nessas células GtHs que na verdade correspondem às cisternas dilatadas do retículo endoplasmático rugoso (Parreira, 1998). Esses vacúolos são exclusivos das células gonadotrópicas e estão relacionadas com o ciclo reprodutivo (Parreira, 1998; Nóbrega, 2006).

Apesar de existirem estudos que caracterizam as células GtHs em várias espécies de teleósteos, foram poucas as espécies que as GtHs tenham sido isolada, purificada e produzidas anticorpos específicos. Os anticorpos normalmente disponíveis para as reações imuno-histoquímica são de salmão (*Oncorhynchus keta*), de catfish (*Clarias gariepinus*), de carpa (*Cyprinus carpio*), sendo estes, os anticorpos utilizados para identificar as células GtHs em teleósteos. É importante salientar que, embora as seqüências do β -FSH e β -LH de várias espécies de teleósteos tenham sido identificadas, apenas uma espécie da ordem Characiformes teve a subunidade β seqüenciada (Melo, 2006) e até o momento não foi produzido nenhum anticorpo que esteja disponível para realizar estudos imuno-histoquímicos em espécies dessa ordem.

Ao utilizar anticorpos, anti-GtHs de salmão (β -FSH e β -LH) em *S. hilarii*, foi observado que as células GtHs são pouco imunorreativas a esses anticorpos. Entretanto, essa imunomarcação é bem menor se comparado a estudos realizados paralelamente ao presente trabalho (Nóbrega, 2006), com *Serrasalmus spilopleura* e *Pimelodus maculatus*. Nóbrega (2006) utilizou os mesmos anticorpos e protocolo que o presente estudo. Vale ressaltar que a

espécie *S. spilopleura* também é uma espécie que pertence à ordem Characiformes, família Characidae, mesma classificação (ordem e família) que a *S. hilarii*.

De uma forma geral, sugere-se que a fraca imunomarcção quando se utiliza anticorpos de salmão em estudos imuno-histoquímico em *S. hilarii*, pode ser devido as diferenças encontradas por Melo (2006) na seqüência de aminoácidos do hormônio β -FSH da tabarana quando comparadas ao β -FSH de salmão. É importante salientar que, Melo (2006) utilizou como iniciadores (“*primers*”) estabelecidos para a subunidade β do gene FSH de salmão (*Oncorhynchus tshawytscha*), e observou diferenças na seqüência dos aminoácidos entre as duas espécies (*S. hilarii* e *O. tshawytscha*). Além disso, ao utilizar o β -FSH de salmão, as secções histológicas adjacentes apresentam mais reação de fundo (*background*) do que com o anticorpo β -LH, apesar das reações terem seguido o mesmo protocolo, e várias diluições dos anticorpos terem sido testadas.

Embora os anticorpos doados pelo Dr. Kawauchi e Dr. Shimizu são da mesma espécie de salmão (*Oncorhynchus keta*). No entanto, o anticorpo doado pelo Dr. Shimizu é de um fragmento conservado das GtHs e o anticorpo doado pelo Dr. Kawauchi é da molécula inteira das GtHs. As diferenças observadas na imunomarcção desses dois anticorpos em *S. hilarii*, talvez seja devido às diferenças encontradas na seqüência dos aminoácidos entre as duas espécies (Melo, 2006), pois, o fragmento da molécula do Dr. Shimizu, pode conter uma menor diferença na seqüência dos aminoácidos do que as diferenças encontradas na molécula inteira. Tal fato, explicaria a maior imunomarcção das células β -FSH e β -LH dos anticorpos doados pelo Dr. Shimizu.

Além desses anticorpos de salmão, foram utilizados também no presente estudo, os anticorpos de *Fundulus heteroclitus* (Cyprinodontiformes), que não apresentou reação positiva na imuno-histoquímica em *S. hilarii*. As espécies da ordem Cyprinodontiformes são consideradas espécies mais “derivadas” se comparadas com as espécies da ordem Characiformes (Nelson, 1994). Esses dados sugerem que os Cyprinodontiformes e os Salmoniformes pertencem a um grupo filogeneticamente mais distante do que os Characiformes, grupo a que pertence a tabarana (Fink & Fink, 1981; Nelson,

1994). Adicionalmente, Shimizu *et al.*, (2003a) utilizaram esse anticorpo de *F. heteroclitus* em várias espécies de teleósteos (45 espécies em 25 ordens), no entanto, uma forte imunomarcacão com β -FSH e β -LH só ocorreu em espécies consideradas filogeneticamente mais “derivadas”. Em *Paracheirodon innesi*, uma espécie que pertence a ordem Characiformes, não foi observada imunomarcacão com o β -FSH e com o β -LH foi observada uma leve imunomarcacão (Shimizu *et al.*, 2003a), indicando que o anticorpo de *F. heteroclitus* é ineficiente para identificar as células GtHs em espécies da ordem Characiformes e em espécies consideradas filogeneticamente “menos derivadas” (Shimizu *et al.*, 2003a).

A seqüência de aminoácidos obtida por Melo (2006) para o β -FSH de *S. hilarii*, ao ser comparado com as seqüências de aminoácidos de espécies das ordens Siluriformes e Cypriniformes, indicam maior proximidade de Characiformes com Siluriformes do que com Cypriniformes. Esses resultados corroboram os estudos filogenéticos realizados por Fink & Fink (1981), no qual, esses autores apontam uma maior proximidade entre Characiformes e Siluriformes do que com os Cypriniformes. Além disso, Melo (2006), apresenta que os códons de terminacão da seqüência do β -FSH para Siluriformes, são idênticos ao de *S. hilarii*, enquanto que esses diferem dos códons de terminacão nos Cypriniformes estudados.

Como, não foi realizado no presente estudo, a reacão de imuno-histoquímica com os anticorpos de GtHs de Siluriformes em *S. hilarii*, devido a indisponibilidade desses anticorpos, não foi possível analisar essas relacões entre Characiformes, Siluriformes e Cypriniformes.

De uma forma geral, ao utilizar os anticorpos de carpa (Cypriniformes) para as GtHs de *S. hilarii*, foi observada uma maior imunomarcacão se comparadas às reacões com os anticorpos de salmão, indicando uma maior proximidade de Cypriniformes com a ordem Characiformes do que com a ordem Salmoniformes (Nelson, 1994). No entanto, a imunomarcacão com todos os anticorpos utilizados no presente trabalho para as GtHs (tabela 01), apresentou uma fraca marcação se comparados com outros estudos que caracterizaram as células gonadotrópicas em outras espécies de teleósteos (Vissio *et al.*, 1997; García-Ayala *et al.*, 1998; Segura-Noguera *et al.*, 2000;

Laiz-Carrión *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 2003a; Weltzien *et al.*, 2004; Nóbrega, 2006; Borella *et al.*, 2006; Antoneli, 2006).

O papel fisiológico das gonadotropinas na reprodução de espécies da ordem Salmoniformes tem sido intensamente investigado e parece estar bem clara a função das GtHs nessas espécies (Nozaki *et al.*, 1990a; Nozaki *et al.*, 1990b; Naito *et al.*, 1991). Entretanto, para os não-salmonídeos, a função das GtHs e variações dessas células durante o ciclo reprodutivo ainda é pouco entendida, principalmente para as espécies neotropicais. A principal razão dessa falta de estudos em não-salmonídeos, é que essas investigações sobre as GtHs requerem hormônios altamente purificados e bioativos (Shimizu *et al.*, 2003b). Além disso, ensaios para dosagem de concentrações de GtHs no plasma têm sido desenvolvido apenas para salmonídeos (Shimizu *et al.*, 2003b).

Em resumo, foram observados variações nas células GtHs em *S. hilarii* durante o ciclo reprodutivo e estas considerações serão discutidas a seguir.

5.3.5 – Dualidade das células gonadotrópicas de *Salminus hilarii*: uma ou duas células produtoras de hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante?

Em várias espécies de teleósteos foram identificadas duas gonadotropinas como mencionado anteriormente, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Adicionalmente, está claro que FSH e LH são liberadas várias vezes durante o ciclo reprodutivo nos teleósteos (Nozaki *et al.*, 1990a; Nozaki *et al.*, 1990b; Naito *et al.*, 1991; Swanson *et al.*, 2003; Weltzien *et al.*, 2004). No entanto, não está claro se uma simples célula gonadotrópica sintetiza e libera FSH e LH, como ocorre em mamíferos, ou se dois tipos distintos de células contêm FSH e LH como visto em algumas espécies de teleósteos (Kawauchi *et al.*, 1989; Naito *et al.*, 1991; Garcia-Hernández *et al.*, 1996; Kagawa *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 2003b; Weltzien *et al.*, 2004).

Vários estudos realizados com salmonídeos indicam que a adeno-hipófise dessas espécies contém dois tipos de células que produzem

gonadotropinas, ou seja, uma célula produz FSH e outra célula produz LH (Nozaki *et al.*, 1990a; Nozaki *et al.*, 1990b; Weltzien *et al.*, 2004), entretanto, evidências para um ou dois tipos de células produtoras de FSH e LH na região da adeno-hipófise em espécies não-salmonídeos tem sido controverso (Shimizu *et al.*, 2003b; Weltzien *et al.*, 2004; Nóbrega, 2006).

De uma forma geral, a dualidade das GtHs em teleósteos foi primeiramente estabelecida para as espécies da ordem Salmoniformes (Itoh *et al.*, 1988; Suzuki *et al.*, 1988a; Suzuki *et al.*, 1988b; Nozaki *et al.*, 1990a; Nozaki *et al.*, 1990b; Naito *et al.*, 1991). Alguns estudos têm sido conduzido sobre várias espécies de teleósteos (não-salmonídeos) para analisar essa dualidade das células GtHs, entretanto, os respectivos papéis das duas GtHs ainda continua incerto (Shimizu *et al.*, 2003b; Weltzien *et al.*, 2004). Além disso, no “catfish” africano foi observada apenas uma GtH (Koide *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1995; Agulleiro *et al.*, 2006), assim como foi encontrada apenas uma GtH na lampréia (Agnata – Petromyzontiformes) (Sower *et al.*, 2006).

Em relação às células gonadotrópicas em *S. hilarii*, o uso de anticorpos β -FSH, β -LH (de salmão), α - β -GtH e β -GtH (de carpa), revelam diferentes padrões de imunomarcacão nas células gonadotrópicas da tabarana. Por outro lado, algumas células gonadotrópicas foram imunorreativas com ambos os anticorpos, tanto os de salmão, quanto os de carpa. Esses resultados sugerem que a mesma célula produz FSH e LH como observado em outros estudos (Garcia-Hernández *et al.*, 1996; Nóbrega, 2006). Entretanto, mais investigações das células gonadotrópicas são necessárias em *S. hilarii* para esclarecer esta questão a respeito da dualidade das células FSH e LH.

Além desses resultados obtidos para as células gonadotrópicas em *S. hilarii*, não foi possível observar diferenças na imunomarcacão entre os grupos experimentais, no entanto, Mousa & Mousa, (2000) estudando as células gonadotrópicas em machos de *Mugil cephalus* durante o ciclo reprodutivo em ambos ambientes (natural e cativeiro), apresentam que as células GtHs durante o ciclo testicular, aumentam a intensidade de imunomarcacão, granulação, hipertrofia e hiperplasia durante a maturação gonadal. Entretanto, degranulação, vacuolarização e a fraca imunomarcacão dessas células só ocorre durante a espermiacão. Em cativeiro, as células GtHs mostra-se com alta atividade de síntese e secreção, mas a atividade reprodutiva diminui, assim

como observado nos baixos valores de IGS e precoce reabsorção dos testículos.

Apesar das células GtHs mostrarem-se com alta atividade de síntese e secreção em *Mugil cephalus* em cativeiro, Mousa (1994 *apud* Mousa & Mousa, 2000), sugere que o baixo rendimento na reprodução em machos de cativeiro seja devido a baixa produção de testosterona pelos testículos. Essas influências das concentrações dos esteróides sexuais plasmáticos entre os ambientes durante o ciclo reprodutivo de *S. hilarii*, serão discutidos a seguir (item 5.6).

5.4 – Perfil plasmático dos esteróides gonadais de *Salminus hilarii* em relação ao ciclo reprodutivo e entre os grupos experimentais

Como mencionado anteriormente, as gonadotropinas estimulam a produção dos esteróides gonadais nas camadas foliculares dos oócitos e nas células de Leydig nos testículos (Borg, 1994; Peter & Yu, 1997; Blázquez *et al.*, 1998; Weltzien *et al.*, 2004). Esses esteróides possuem um papel fisiológico fundamental no desenvolvimento, crescimento, maturação gonadal e no controle de alguns processos reprodutivo em fêmeas e machos de teleósteos (Peter & Yu, 1997; Blázquez *et al.*, 1998; Martyniuk *et al.*, 2006), assim como nos demais vertebrados. Os esteróides gonadais normalmente quantificados no plasma dos peixes são: 17 β -estradiol (E₂), 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP) e testosterona (T).

O hormônio folículo estimulante liberado pela adeno-hipófise chega às camadas foliculares dos oócitos e na camada teca, estimula a conversão do colesterol em testosterona (Kagawa, 1994; Peter & Yu, 1997; Blázquez *et al.*, 1998). A T é transportada para a camada granulosa, e aromatizada a E₂, que é liberado para a corrente sangüínea, estimulando o fígado a produzir a vitelogenina. A ação dos estrógenos está relacionada à síntese hepática de vitelogenina, uma glicolipofosfoproteína que é precursora do vitelo do oócito (Peter & Yu, 1997). De uma forma geral o E₂ é considerado um dos principais esteróides na maturação dos teleósteos (Kagawa, 1994; Peter & Yu, 1997;

Blázquez *et al.*, 1998). Adicionalmente, é observado um aumento dos níveis plasmáticos de estrógenos durante a vitelogênese, principalmente do E₂, que está correlacionado com o crescimento do oócitos, devido à incorporação de vitelogenina (Peter & Yu, 1997).

Na literatura, muitos trabalhos que abordam o perfil de esteróides gonadais em relação ao ciclo reprodutivo em teleósteos de clima temperado foram realizados. Para as espécies nacionais, poucas informações estão disponíveis com relação ao perfil de esteróides, sendo investigados em: *Piaractus mesopotamicus* (Gazola *et al.*, 1996; Gazola & Borella, 1997; Iseki, 2002), *Colossoma macropomum* (Venturieri, 1997), *Salminus brasiliensis* (Moreira *et al.*, 1999), *Rhamdia quelen* (Barcellos *et al.*, 2001) e *Synbranchus marmoratus* (Antoneli, 2006).

O E₂ em *S. hilarii* aumenta com o avanço da maturação gonadal, tanto para os animais de cativeiro quanto para animais coletados no ambiente natural. Esse resultado também foi observado para outros teleósteos nacionais (Venturieri, 1997; Moreira *et al.*, 1999; Barcellos *et al.*, 2001; Iseki, 2002; Antoneli, 2006). De uma forma geral, os níveis plasmáticos de E₂ na tabarana aumentam durante a vitelogênese, atingindo picos próximos do período de ovulação, indicando também que o E₂ regula a vitelogênese nesta espécie. Considerando ainda, que o E₂ é o esteróide responsável pela síntese da glicolipofosfoproteína (vitelogenina) como supracitado, é de se esperar que seu incremento fosse observado nos estádios de maturação, ou seja, ocorre um aumento no estágio maturação inicial até a fase final da vitelogênese, após este período, a concentração de E₂ tende a diminuir nos sucessivos estádios. Esse perfil foi observado no presente trabalho.

Ao final da fase de vitelogênese, é observada uma leve queda na concentração de E₂ no plasma dos animais (cativeiro e ambiente natural), e essa queda provavelmente seja devido ao aumento na síntese da 17 α , 20 β -dihidroxy-4-pregnen-3-one (17 α ,20 β -DHP) (Peter & Yu, 1997; Nagahama, 1997; Planas *et al.*, 2000).

A síntese de 17 α , 20 β -dihidroxy-4-pregnen-3-one é estimulada também pelas gonadotropinas (principalmente o hormônio luteinizante), que são liberados pela adeno-hipófise (Peter & Yu, 1997). O LH chega a camada teca e estimula a conversão do colesterol a 17 α -hidroxiprogesterona, que é

transportada a camada granulosa e convertida a 17α , 20β -dihidroxy-4-pregnen-3-one. Este último é considerado um hormônio crítico para a “quebra da vesícula germinativa” e na preparação do oócito para a fertilização (Peter & Yu, 1997; Nagahama, 1997; Planas *et al.*, 2000).

O 17α , 20β -DHP é o hormônio responsável pela maturação final e ovulação em teleósteos (MIS, do inglês “*maturation-inducing hormone*” – “hormônio indutor da maturação final”), sendo o 17α -OHP seu precursor (Nagahama, 1997; Peter & Yu, 1997). No presente estudo, foi quantificado apenas o 17α -OHP, pois, a determinação plasmática deste progestágeno não é possível com o uso de “kits” comerciais de elisaimunonsaio (ELISA), pois estes não são disponíveis no mercado para 17α , 20β -DHP.

Os valores de 17α -OHP nos animais de ambiente impactado (barragens e cativeiro), foram maiores se comparados aos animais de ambiente natural. Neste caso, pode-se sugerir que os animais de ambiente impactado apresentam alguma disfunção fisiológica na conversão do 17α -OHP para o 17α , 20β -DHP, o que explicaria o porque desses animais não conseguirem desovar em ambientes impactados (principalmente em cativeiro), pois, como supracitado o 17α , 20β -DHP é o hormônio indutor da maturação final e ovulação em teleósteos (Nagahama, 1997).

A conversão de 17α -hidroxiprogesterona para 17α , 20β -dihidroxy-4-pregnen-3-one é potencializada pela ação da 20β -hidroxiesteróide desidrogenase (20β -HSD) (Nagahama, 1994; Kagawa, 1994), sugerindo que o confinamento dos animais estaria afetando a ação desta enzima e conseqüentemente atuando neste nível, haveria um acúmulo do progestágeno precursor que não seria convertido no MIS (o que foi corroborado no presente estudo).

A ovulação é definida como o ato de liberação do oócito maduro do folículo, esse processo requer a separação do oócito das camadas foliculares (teca e granulosa) e ruptura desse folículo e a expulsão ativa do oócito através desse sítio de ruptura (Goetz & Garczynski, 1997). O mecanismo de controle desse processo envolve a ação de vários reguladores ovarianos, e podemos citar as proteases, esteróides, catecolaminas entre outros (Goetz & Garczynski, 1997). Neste caso, são necessários mais estudos sobre o mecanismo de

ovulação em espécies nacionais, pois, os peixes de piracema, geralmente não ovulam no cativeiro sem a intervenção hormonal.

Os andrógenos podem ser definidos como hormônios que estimulam o aparecimento dos caracteres sexuais secundários nos machos, comportamento reprodutivo, diferenciação sexual e espermatogênese (Borg, 1994). Os andrógenos, testosterona e 11-cetotestosterona, produzidos pelas células de Leydig, são os hormônios mais importantes na espermatogênese em teleósteos (Borg, 1994). Entretanto, em fêmeas, a testosterona é importante apenas como precursor do E_2 (Peter & Yu, 1997; Nagahama, 1997; Planas *et al.*, 2000).

A T é usada como substrato para a síntese de E_2 como supracitado, sendo que, no presente estudo, a T aumenta com o avanço da maturação gonadal, como foi observado para o E_2 . Estes resultados demonstram que a T obteve uma alta concentração durante a fase final de vitelogênese, evidenciando uma interdependência entre esses dois hormônios (T e E_2). Esse perfil sugere também que as alterações plasmática de T estão relacionadas ao seu papel precursor na produção de E_2 em *S. hilarii*. Adicionalmente, Fostier *et al.*, (1987), comentam que a alteração de T seria o resultado das diferenças na taxa de síntese ou metabolismo desse hormônio e que não seria preconizado um papel fisiológico direto na vitelogênese.

Devido ao baixo número de machos capturados, não foi possível realizar qualquer análise desse importante esteróide gonadal (T) na fisiologia reprodutiva de machos de *S. hilarii*.

Em um trabalho paralelo a este, Melo (2006) quantificou os níveis de expressão de FSH e LH nesta mesma espécie (*S. hilarii*), e assim, podemos discutir a expressão destas GtHs com a concentração plasmática de esteróides gonadais obtidas no presente estudo.

Analisando-se os níveis de expressão das gonadotropinas durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no ambiente natural, é observada uma queda na expressão de FSH durante o ciclo reprodutivo, ou seja, ocorre uma queda na síntese desta gonadotropina na transição do estágio repouso para o estágio maduro, aumentando em seguida no estágio regressão/esgotado (Melo, 2006). No entanto, em animais de ambiente impactado, a expressão de

FSH já se apresentou baixa e sem variação ao longo do ciclo reprodutivo (Melo, 2006).

Como nas análises dos esteróides gonadais em *S. hilarii*, foi observado um aumento na concentração de E_2 com o avanço do ciclo reprodutivo e uma queda (não significativa) no estágio maduro, esses dados corroboram a queda da expressão do FSH nos animais capturados num estágio mais avançado de maturação, via controle de *feedback negativo*, como proposto na literatura (Peter & Yu, 1997; Rocha & Rocha, 2006).

A queda na expressão do FSH nas fêmeas de *S. hilarii* em fases mais avançadas de maturação está acompanhada pelo aumento na expressão de LH (Melo, 2006), que também corroboram os dados dos esteróides gonadais, pois, observa-se um aumento na síntese de 17α -hidroxiprogesterona, na chegada da fase de maturação avançada (ambiente natural).

Ao comparar os níveis de expressão de LH entre o ambiente natural e cativeiro (Melo, 2006), podemos observar que, no cativeiro a expressão de LH é bem menor se comparado com a expressão no ambiente natural (em torno de 3 vezes menor) (Melo, 2006). Entretanto, a produção de 17α -hidroxiprogesterona no cativeiro foi maior que aquela observada nos animais de ambiente natural. Esses dados sugerem a possibilidade de 17α -hidroxiprogesterona não estar sendo convertida em 17α , 20β -dihidroxy-4-pregnen-3-one, e por este motivo, os animais de cativeiro não ovulem e nem se reproduzem de forma natural em ambientes impactados.

6 – Conclusões

O objetivo do presente estudo foi plenamente cumprido, permitindo concluir que:

1 – Na Bacia do Alto Rio Tietê, o período reprodutivo de *Salminus hilarii* está compreendido entre os meses de outubro a fevereiro, o desenvolvimento oocitário é do tipo sincrônico em grupo e a desova é do tipo total. Adicionalmente, foi observado um deslocamento temporal do ciclo reprodutivo em animais mantidos em cativeiro;

2 – Nos ovários de *S. hilarii* foram identificados cinco tipos celulares ao longo do ciclo reprodutivo: oogônias, oócitos perinucleolar, oócito cortical-alveolar, oócito vitelogênico e oócito maduro. Além de estruturas derivadas desse desenvolvimento, os folículos pós-ovulatórios e os oócitos atrésicos;

3 – Os testículos de *S. hilarii* são do tipo tubular anastomosado e espermatogonial irrestrito. Adicionalmente foram identificados seis tipos celulares no interior dos testículos: espermatogônias, espermatócitos, espermátides, espermatozóides, células de Sertoli e células de Leydig;

4 – As fêmeas de *S. hilarii* coletadas no ambiente natural apresentam maturação completa dos gametas, mas animais no estágio regressão foram capturados neste ambiente, sugerindo que a tabarana de ambiente natural já está sofrendo com os impactos ambientais da região do Alto Rio Tietê. Já as fêmeas privadas de migração reprodutiva (cativeiro) não apresentam a maturação completa dos gametas;

5 – A hipófise de *S. hilarii* segue o mesmo padrão anatômico da maioria dos teleósteos, sendo identificados seis tipos celulares na adeno-hipófise: as células produtoras de prolactina (PRL) e hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) foram identificadas na região da “*rostral pars distalis*”; as células produtoras de hormônio de crescimento (GH) e de gonadotropinas (GtHs) estão situadas na região da “*proximal pars distalis*”; as células produtoras de melanotropina (MSH) e de somatolactina (SL) estão presentes na “*pars intermedia*”;

6 – Em *S. hilarii*, foi identificada a presença de duas gonadotropinas, o hormônio folículo estimulante e o hormônio luteinizante. Adicionalmente, foi verificado que estas células variam com o desenvolvimento gonadal e que os anticorpos de salmão (*chum salmon*) não são adequados para Characidae;

7 – As células produtoras de prolactina, não apresentam variações de imunomarcacão em relação ao ciclo reprodutivo;

8 – A porcentagem de imunomarcacão para o hormônio de crescimento é maior no estágio repouso se comparado ao estágio maduro (ambiente natural) e ao estágio maturacão avançada (cativeiro);

9 – A porcentagem de imunomarcacão para somatolactina aumenta com o ciclo reprodutivo de maneira inversa ao hormônio de crescimento;

10 – O 17β -estradiol aumenta com o avanço do ciclo reprodutivo em *S. hilarii* e diminui no estágio maduro para o estágio regressão/esgotado (ambiente natural). No cativeiro ocorreu um aumento da concentraçao de 17β -estradiol do estágio repouso até o estágio maturacão média, diminuindo logo em seguida nos estádios maturacão avançada e regressão/esgotado.

11 – A concentração de testosterona eleva-se com o avanço da maturação gonadal, atingindo os valores máximos no estágio maduro (ambiente natural) e maturação avançada (cativeiro). Paralelamente a isso, o 17β -estradiol apresentou-se alto somente na maturação média (cativeiro) e maduro (ambiente natural), evidenciando uma relação entre esses dois hormônios;

12 – Os valores obtidos para 17α -hidroxiprogesterona não apresentaram diferenças significativas entre os estádios reprodutivos em nenhum dos grupos experimentais. No entanto, as maiores concentrações de 17α -hidroxiprogesterona foram observadas em fêmeas de cativeiro, mesmo se comparadas com as fêmeas capturadas no ambiente natural. Sugere-se que o problema na desova em espécies reofílicas impedidas de migrar, esteja ocorrendo na conversão da 17α -hidroxiprogesterona para 17α , 20β -dihidroxy-4-pregnen-3-one, este último é considerado o hormônio indutor da maturação final e ovulação em teleósteos.

13 – Ambientes impactados alteram a fisiologia do eixo hipófise-gônadas em *Salminus hilarii*.

7 – Referências Bibliográficas.

- Acher, R. 1996. Molecular evolution of fish neurohypophysial hormones: neutral and selective evolutionary mechanisms. Review. *General and Comparative Endocrinology* 102: 157-172.
- Agostinho, A. A. & Gomes, L. C. 2005. O manejo da pesca em reservatórios da bacia do Alto Rio Paraná: avaliação e perspectivas. 23-55. **In:** Nogueira, M. G.; Henry, R. & Jorcin, A. (Org). 2005. *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata*. Editora Rima. 459p.
- Agostinho, A. A.; Gomes, L. C & Pelicice, F. M. 2007. *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. Maringá. EDUEM. 501p.
- Agostinho, A. A.; Gomes, L. C.; Suzuki, H. I. & Júlio, H. F. 2003. Migratory fish from the upper Paraná River Basin, Brazil. 19-99. **In:** Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C. & Baer, A. (Eds). 2003. *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*. World Fisheries Trust. The World Bank and the International Development Research Centre. Victoria. 372p.
- Agostinho, A. A.; Miranda, L. E.; Bini, L. M.; Gomes, L. C.; Thomaz, S. M. & Suzuki, H. I. 1999. Patters of colonization in neotropical reservoirs and prognoses on aging. 227-265. **In:** Tundisi, J. G. & Straskraba, M. (Org). 1999. *Theoretical reservoir ecology and its applications*. São Carlos/SP. Backhuys Publishers/International Institute of Ecology. 585p.
- Agulleiro, B.; Garcia-Hernández, M. P. & García-Ayala, A. 2006. Teleost adenohypophysis: morphofunctional and developmental aspects. 287-323. **In:** Reinecke, M.; Zaccone, G. & Kappor, B. G. 2006. *Fish Endocrinology*. Science Publishers. volume 01. 440p.
- Amaral, J. S. 2005. Perfil dos esteróides gonadais durante o ciclo reprodutivo da tabarana (*Salminus hilarii*) no ambiente natural: correlação com as variáveis ambientais. *Relatório entregue ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)*. Universidade de Mogi das Cruzes. 15p.

- Amaral, J. S. 2006. Perfil dos esteróides gonadais durante o ciclo reprodutivo da tabarana (*Salminus hilarii*) em cativeiro: correlação com as variáveis ambientais. *Relatório entregue ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)*. Universidade de Mogi das Cruzes. 25p.
- Amaral, J. S.; Honji, R. M. & Moreira, R. G. 2005. Perfil dos esteróides gonadais durante o ciclo reprodutivo da tabarana (*Salminus hilarii*) no ambiente natural: correlação com as variáveis ambientais. **In:** VIII Congresso de Iniciação Científica. Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo. p: 36.
- Amaral, J. S.; Honji, R. M. & Moreira, R. G. 2006. Steroids profile during the reproductive cycle of tabarana (*Salminus hilarii*), in natural environment and captivity. **In:** VIIth International Congress on the Biology of Fish. St. John's, Newfoundland, Canada. p: 51.
- Amaral, J. S.; Mello, R. G.; Honji, R. M. & Moreira, R. G. 2007. Effects of migration impediment of *Salminus hilarii* (Teleost: Characidae) on the pituitary–gonad axis. **In:** 7th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB). Comparative Biochemistry and Physiology (CBP). Salvador, Bahia. Brazil. 148A. Suppl. 1. p: S44.
- Andrade, D. R.; Godinho, A. L.; Godinho, H. P. & Shimoda, E. 2006. Biologia reprodutiva da tabarana, *Salminus hilarii* (Osteichthyes, Characidae) na represa de três Marias, MG. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 28 (1): 26-32.
- Antoneli, F. N. 2006. Perfil morfo-funcional da inversão de sexo em Synbranchidae (Teleostei: Synbranchiformes). *Tese de Doutorado*. Universidade Estadual de Campinas. 164p.
- Ayala, A. G.; Villaplana, M.; Garcia-Hernández, M. P.; Pozo, E. C. & Agulleiro. 2003. FSH-, LH-, and TSH-expressing cells during development of *Sparus aurata* L. (Teleostei). An immunocytochemical study. *General and Comparative Endocrinology* 134: 72-79.
- Baldisserotto, B. 2002. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Rio Grande do Sul, Ed. UFSM. 212p.
- Barcellos, L. J. G.; Wassermann, G. F.; Scott, A. P.; Woehl, V. M.; Quevedo, R. M.; Ittzés, I.; Krieger, M. H. & Lulhier, F. 2001. Steroid profile in cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces

- Teleostei), during the first reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 121: 325-332.
- Batlouni, S. R. 2004. Ciclo reprodutivo de machos de *P. fasciatum* e análise da estrutura do epitélio germinativo com ênfase nas junções celulares. *Dissertação de Doutorado*. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo ICB-USP. 122p.
- Batlouni, S. R.; Romagosa, E. & Borella, M. I. 2006. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction Science* 96: 116-132.
- Batten, T. F. C.; Moons, L. & Vandesande, F. 1999. Innervation and control of the adenohypophysis by hypothalamic peptidergic neurons in teleost fishes: EM immunohistochemical evidence. *Microscopy Research Technique* 44: 19-35.
- 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.
- Bendazoli, A.; Rossi-Wongtschowski, C. L. D. B. & Dias, W. J. 1990. Fator de condição. 29-30. **In:** Bendazoli, A. & Rossi-Wongtschowski, C. L. D. B. 1990. *A manjuba do Rio Ribeira de Iguape: biologia, comportamento e avaliação de estoque*. São Paulo. IBAMA/IP/Sema. 125p.
- Beolchi, G. S.; Batlouni, S. R.; Romagosa, E. & Borella, M. I. 2003. Estudos histoquímico e Imuno-histoquímico da hipófise de cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* criados em cativeiro. **In:** *Congresso Científico do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo*. São Paulo-SP, Brasil.
- Björnsson, B. T. 1997. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiology and Biochemistry* 17: 9-24.
- Blázquez, M.; Bosma, P. T.; Fraser, E. J.; Van Look, K. J. W. & Trudeau, V. L. 1998. Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comparative Biochemistry and Physiology (C)* 119: 345-364.
- Borella, M. I.; Batlouni, S. R.; Venturieri, R. & Mancera, J. M. 2003b. Hipófise de aruanã *Osteoglossum bicirrhosum* Cuvier, 1824. Histoquímica e Imuno-

- histoquímica. **In:** *Congresso Científico do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo*. São Paulo-SP, Brasil.
- Borella, M. I.; Gazola, R. Val-Sella, M. V. & Fava-de-Moraes, F. 1997. Histochemical and immunohistochemical study of the pituitary gland of the South-American teleost pacu fish *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). *Brazilian Journal Morphological Sciences* 14 (2): 219-225.
- Borella, M. I.; Venturieri, R. & Mancera, J. M. 2003a. Análise preliminar da hipófise do pirarucu (*Arapaima gigas*). Histoquímica e Imuno-histoquímica. **In:** *1º Simpósio de Morfofisiologia da Amazônia*. Belém-PA, Brasil. p. 94.
- Borella, M. I.; Venturieri, R. L. L.; Batlouni, S. R. & Mancera, J. M. 2006. Aspectos morfofisiológicos comparativos da hipófise de Osteoglossídeos. 53-65. **In:** Cyrino, J. E. P. & Urbinati, E. C. 2006. *Tópicos especiais em biologia aquática e aquicultura*. São Paulo. Jaboticabal. 291p.
- Borg, B. 1994. Androgens in teleost fishes. Mini review. *Comparative Biochemistry and Physiology (C)* 109: 219-245.
- Borghetti, N. R. B.; Ostrensky, A. & Borghetti, J. R. 2003. *Aquicultura. Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no Mundo*. Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais. 128p.
- Brasil. 2004. Instrução normativa N° 05 de 21 de maio de 2004. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Ministério do Meio Ambiente.
- Brown-Peterson, N. J.; Grier, H. J. & Overstreet, R. M. 2002. Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. *Journal of Fish Biology* 60: 178-202.
- Cala, F. S.; Portillo, A.; Martín del Río, M. P. & Mancera, J. M. 2003. Immunocytochemical characterization of adenohypophyseal cells in the greater weever fish (*Trachinus draco*). *Tissue & Cell* 35: 169-178.
- Camargo, C. 2007. Efeitos do bloqueio da migração reprodutiva nas reservas metabólicas da tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae). *Dissertação de Mestrado*. Universidade de Mogi das Cruzes. 56p.

- Cambré, M. L.; Verdonck, W.; Ollevier, F.; Vandesande, F.; Batten, T. F. C. & Kühn, E. R. 1986. Immunocytochemical identification and localization of the different cell types in the pituitary of seabass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology* 61: 368-375.
- Canosa, L. F.; Chang, J. P. & Peter, R. E. 2007. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology* 151: 1-26.
- Carneiro, M. H.; Castro, P. M. G.; Tutui, S. L. S. & Bastos, G. C. C. 2005. *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823). 94-100. In: Cergole, M. C.; Ávila-da-Silva, A. O. & Rossi-Wongtschowski, C. L. D. B. (Edts). 2005. *Análise das principais pescarias comerciais da Região Sudeste-Sul do Brasil: dinâmica populacional das espécies em exploração*. Série de Documentos REVIZEE-Score Sul. 176p.
- Cavari, B.; Noso, T. & Kawauchi, H. 1995. Somatolactin, a novel pituitary protein: Isolation and characterization from *Sparus aurata*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 4 (2): 117-122.
- Cergole, M. C. & Rossi-Wongtschowski, C. L. D. B. 2005. *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879). 145-150. In: Cergole, M. C.; Ávila-da-Silva, A. O. & Rossi-Wongtschowski, C. L. D. B. 2005. *Análise das principais pescarias comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil: Dinâmica populacional das espécies em exploração*. Série de Documentos REVIZEE Score-Sul. 176p.
- Cinquetti, R. & Dramis, L. 2006. Identification and localization of hormone-producing cells in the pituitary of male *Padogobius martensi* (Pisces, Gobiidae): a histochemical and immunocytochemical study. *Journal of Fish Biology*. (Supplement B) 68: 235-250.
- Cyr, D. G. & Eales, J. G. 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6: 165-200.
- Dias, J. F. 1989. Padrões reprodutivos em teleósteos da costa brasileira: uma síntese. *Dissertação de Mestrado*. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. 105p.
- Dias, J. F.; Peres-Rios, E.; Chaves, P. T. C. & Rossi-Wongtschowski, C. L. D. B. 1998. Análise macroscópica dos ovários de teleósteos: problemas de

- classificação e recomendações de procedimentos. *Revista Brasileira de Biologia* 58 (1): 55-69.
- Drummond, C. D.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. & Sato, Y. 2000. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. *Journal of Experimental Zoology* 287: 176-182.
- Duarte, G.; Noguera, M. M. S.; Martín del Río, M. P. & Mancera, J. M. 2001. The hypothalamo-hypophyseal system of the white seabream *Diplodus sargus*: immunocytochemical identification of arginine-vasotocin, isotocin, melanin-concentrating hormone and corticotropin-releasing factor. *The Histochemical Journal* 33: 568-578.
- Dubois, E. A.; Zandbergen, M. A.; Peute, J. & Goos, H. J. 2002. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain Research Bulletin* 57: 413-418.
- FAO – Fisheries Department. 2006. *State of world aquaculture*. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations. 145p. <http://www.fao.org>
- Farbridge, K. J. & Leatherland, J. F. 1986. A comparative immunohistochemical study of the pars distalis in six species of teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 1 (1): 63 – 74.
- Fink, S. V. & Fink, W. L. 1981. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). *Zoological Journal of the Linnean Society* 72: 297-353.
- Foo, J. T. W. & Lam, T. J. 1993. Retardation of ovarian growth and depression of serum steroid levels in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, by cortisol implantation. *Aquaculture* 115: 133-143.
- Forsyth, I. A. & Wallis, M. 2002. Growth hormone and prolactin-molecular and functional evolution. *Journal Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7 (3): 291-312.
- Fostier, A.; Le Gac, F. & Loir, M. 1987. Steroids in male reproduction. In: *International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Newfoundland. Proceeding. University Newfoundland. 239-245.
- García-Ayala, A.; Garcia-Hernández, M. P.; Quesada, J. A. & Agulleiro, B. 1998. Gonadotropic and thyrotropic cells from the mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*, Risso 1810): immunocytochemical and ultrastructural characterization. *The Anatomical Record* 250: 448-458.

- García-Ayala, A.; Garcia-Hernández, M. P.; Quesada, J. A. & Agulleiro, B. 1997. Immunocytochemical and ultrastructural characterization of prolactin, growth hormonal and somatolactin cells from the mediterranean yellowtail (*Seriola dumerillii*, Risso 1810). *The Anatomical Record* 247: 395-404.
- Garcia-Hernández, M. P.; García-Ayala, A.; Elbal, M. T. & Agulleiro, B. 1996. The adenohipophysis of mediterranean yellowtail *Seriola dumerillii* (Risso, 1810): an immunocytochemical study. *Tissue & Cell* 28 (5): 577-585.
- Garcia-Hernández, M. P.; García-Ayala, A.; Quesada, J. A. & Agulleiro, B. 1997. Immunocytochemical and ultrastructural characterization of melanotropin and adrenocorticotropin cells from the mediterranean yellowtail (*Seriola dumerillii*, Risso 1810). *The Anatomical Record* 249: 74-80.
- García-López, A.; Fernández-Pasquier, V.; Couto, E.; Canario, A. V. M.; Sarasquete, C. & Matínez-Rodríguez, G. 2006. Testicular development and plasma sex steroid levels in cultured male Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup. *General and Comparative Endocrinology* 147: 343-351.
- Gazola, R. & Borella, M. I. 1997. Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). *Brazilian Journal Medical Biological Research* 30: 1485-1487.
- Gazola, R.; Borella, M. I.; Donaldson, E. M.; Val-Sella, M. V.; Sukumasavin, N.; Fava-de-Moraes, F. & Bernardino, G. 1996. Plasma steroid and corticosteroid levels in female pacu *Piaractus mesopotamicus*, Teleostei-Characidae. *Brazilian Journal Medical Biological Research* 29: 659-664.
- Godinho, H. P.; Santos, J. E.; Formagio, P. S. & Guimarães-Cruz, R. J. 2005. Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). *Acta Zoologica* (Stockholm). 86: 289-294.
- Godoy, 1975. *Peixes do Brasil – Sub-ordem Characoidei*. Bacia do Rio Mogi-Guaçu, Piracicaba. Editora: Franciscana. 4 volumes.

- Goetz, F. W. & Garczynski, M. 1997. The ovarian regulation of ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 17: 33-38.
- Goksøyr, A.; Arukwe, A.; Larsson, J.; Cajaraville, M. P.; Hauser, L.; Nilsen, B. M.; Lowe, D. & Matthiessen. 2003. Molecular/Cellular processes and the impact on reproduction. 179-220. **In:** Lawrence, A. J. & Hemingway, K. J. 2003. *Effects of pollution on fish. Molecular effects and population response*. Blackwell Publishing. 342p.
- Gomiero, L. M. & Braga, F. M. S. 2004. Reproduction of species of the genus *Cichla* in a reservoir in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 64 (3): 613-624.
- Gorbman, A. & Sower, S. A. 2003. Evolution of the role of GnRH in animal (Metazoan) biology. *General and Comparative Endocrinology* 134: 207-213.
- Graça, W. J. & Pavanelli, C. S. 2007. *Peixes da planície de inundação do Alto Rio Paraná e áreas adjacentes*. Maringá. EDUEM. 241p.
- Grier, H. J. & Lo Nostro, F. 2000. The teleost germinal epithelium: a unifying concept. **In:** Norberg, B.; Kjesbu, O. S.; Taranger, G. L.; Anderson, E. & Stefansson, S. O. (Eds). 2000. *Proceeding of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Bergen. University of Bergen Press.
- Grier, H. J. & Taylor, R. G. 1998. Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology* 53: 521-542.
- Grier, H. J. 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli barrier. **In:** Russel, L. D. & Griswald, M. D. editors. *The Sertoli Cell*. Clearwater: Cache River Press, p. 703-739.
- Grier, H. J.; Linton, J. R.; Leatherland, J. F. & de Vlaming, V. L. 1980. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *American Journal Anatomy* 159: 331-345.
- Guilgur, L. G.; Moncaut, N. P.; Canario, A. V. M. & Somoza, G. M. 2006. Evolution of GnRH ligands and receptors in Gnathostomata. *Comparative Biochemistry Physiology (A)* 144: 272-283.
- Haider, S. G. 2004. Cell biology of Leydig cells in the testis. *International Review of Cytology* 233: 181-241.

- Haimovici, M. & Ignácio, J. M. 2005. *Micropogonias furnieri* (desmarest, 1823). 101-107. **In:** Cergole, M. C.; Ávila-da-Silva, A. O. & Rossi-Wongtschowski, C. L. D. B. (Edts). 2005. *Análise das principais pescarias comerciais da Região Sudeste-Sul do Brasil: dinâmica populacional das espécies em exploração*. Série de Documentos REVIZEE-Score Sul. 176p.
- Hoar, W. S. 1969. Reproduction. 1-72. **In:** Hoar, W. S. & Randall, D. J. 1969. *Fish physiology*. Academic Press. New York and London. 485p.
- Hochachka, P. W. & Somero, G. N. 2002. *Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution*. Oxford. University Press. 466p.
- Honji, R. M.; Borella, M. I. & Moreira, R. G. 2006b. Caracterização do desenvolvimento oocitário da tabarana *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 da Bacia do Alto Tietê, São Paulo-SP. **In:** XXII Congresso Brasileiro de Anatomia/XXVII Congresso Chileno de Anatomía/VIII Congresso de Anatomía del Cono Sur. Florianópolis, SC. p: 109.
- Honji, R. M.; Francischeti, M. A.; Moreira, R. G. & Romagosa, E. 2006d. Aspectos preliminares da biologia reprodutiva da tabarana *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 da Bacia do Alto Tietê, São Paulo-SP. **In:** 17^o Encontro de Biólogo do CRBio-1. Santos-SP, Brasil. p: 122.
- Honji, R. M.; Nóbrega, R. H.; Borella, M. I. & Moreira, R. G. 2006a. Histological and immunohistochemical characterization of adenohypophyseal cells in *Salminus hilarii*. **In:** VIIth International Congress on the Biology of Fish. St. John's, Newfoundland, Canada. p: 124.
- Honji, R. M.; Nóbrega, R. H.; Borella, M. I. & Moreira, R. G. 2007. Identificação histoquímica e imuno-histoquímica das células produtoras de prolactina, hormônio de crescimento e somatolactina da tabarana (*Salminus hilarii*, Valenciennes, 1850) em relação ao ciclo reprodutivo. **In:** XVII Encontro Brasileiro de Ictiologia. Itajaí-SC. Brasil. p: 245.
- Honji, R. M.; Vaz-dos-Santos, A. M. & Rossi-Wongtschowski, C. L. D. B. 2006c. Identification of the stages of ovarian maturation of the argentine hake *Merluccius hubbsi* Marini, 1933 (Teleostei: Merlucciidae): advantages and disadvantages of the use of the macroscopic and microscopic scales. *Neotropical Ichthyology* 4 (3): 329-337.

- Hull, K. L. & Harvey, S. 2002. GH as co-gonadotropin: the relevance of correlative changes in GH secretion and reproductive state. *Journal of Endocrinology* 172: 1-19.
- Iseki, K. K. 2002. Variações endócrinas durante o ciclo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*: efeito da manipulação da temperatura e da fotofase. *Tese de Doutorado*. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 97p.
- Itoh, H.; Suzuki, K. & Kawauchi, H. 1988. The complete amino acid sequences of β -subunits of two distinct chum salmon GtHs. *General and Comparative Endocrinology* 71: 438-451.
- Iwakoshi, E.; Kuroda, K. T.; Fujisawa, Y.; Hisada, M.; Ukena, K.; Tsutsui, K. & Minakata, H. 2002. Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291: 1187-1193.
- Johnson, L. L.; Norberg, B.; Willis, M. L.; Zebroski, H. & Swanson. 1997. Isolation, characterization and radioimmunoassay of atlantic halibut somatolactin and plasma levels during stress and reproduction in flatfish. *General and Comparative Endocrinology* 105: 194-209.
- Junqueira, C. L. & Carneiro, J. 2004. *Histologia básica*. 10ª Edição. Ed. Guanabara Koogan. 540p.
- Kagawa, H. 1994. Oogenesis. 291-304. In: Hochachka, P. W. & Mommsen, T. P. *Analytical techniques. Biochemistry and Molecular biology of fishes*. vol. 3. Elsevier. 700p.
- Kagawa, H.; Kawazoe, I.; Tanaka, H. & Okuzawa, K. 1998. Immunocytochemical identification of two distinct gonadotropic cells (GtH I and GtH II) in the pituitary of bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *General and Comparative Endocrinology* 110: 11-18.
- Kakizawa, S.; Kaneko, T.; Hasegawa, S. & Hirano, T. 1993. Activation of somatolactin cells in the pituitary of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by low environmental calcium. *General and Comparative Endocrinology* 91: 298-306.
- Kakizawa, S.; Kaneko, T.; Hasegawa, S. & Hirano, T. 1995a. Effects of feeding, fasting, background adaptation, acute stress and exhaustive exercise on

- the plasma somatolactin concentrations in rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology* 98: 137-146.
- Kakizawa, S.; Kaneko, T.; Ogasawara, T. & Hirano, T. 1995b. Changes in plasma somatolactin levels during spawning migration of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Fish Physiology and Biochemistry* 14: 93-191.
- Kaneko, T. 1996. Cell biology of somatolactin. *International Review of Cytology* 169: 1-24.
- Kavamoto, E. T.; Barnabé, V. H.; Campos, B. E. S. & Andrade-Talmelli, E. F. 1999. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). *Boletim do Instituto de Pesca* 25: 61-66.
- Kawauchi, H. & Sower, S. A. 2006. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. *General and Comparative Endocrinology*. 148: 3-14.
- Kawauchi, H. 2006. Functions of melanin-concentrating hormone in fish. *Journal of Experimental Zoology* 305 (A): 751-760.
- Kawauchi, H.; Suzuki, K.; Itoh, H.; Swanson, P.; Naito, N.; Nagahama, Y.; Nozaki, M.; Nakai, Y. & Itoh, S. 1989. The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry* 7 (1-6): 29-38.
- King, M. 1995. *Fisheries biology, assessment and management*. Fishing News Books. Blackwell Science Ltd. 341p.
- Koide, Y.; Noso, T.; Schouten, G.; Peute, J.; Zandbergen, M. A.; Bogerd, J.; Schulz, R. W.; Kawauchi, H. & Goos, H. J. 1992. Maturation gonadotropin from the African catfish, *Clarias gariepinus*: purification, characterization, localization and biological activity. *General and Comparative Endocrinology* 87 (3): 327-341.
- Koya, Y.; Mori, H. & Nakagawa, M. 2004. Serum 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels in pregnant and non-pregnant female rockfish, *Sebastes schlegeli*, viviparous teleost and its production by post-ovulatory follicles. *Zoological Science* 21: 565-573.
- Laiz-Carrión, R.; Segura-Noguera, M. D. M.; Martín-del-Río, M. D. P. & Mancera, J. M. 2003. Ontogeny of adenohypophyseal cells in the pituitary of the American shad (*Alosa sapidissima*). *General and Comparative Endocrinology* 132: 454-464.

- Le Gac, F.; Blaise, O.; Fostier, A.; Bail, P. Y. L. 1993. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiology and Biochemistry* 11 (1-6): 219-232.
- Le Gac, F.; Ollitrault, M.; Loir, M. & Bail, P. Y. L. 1992. Evidence for binding and action of growth hormone in trout testis. *Biology Reproduction* 46: 949-957.
- Lethimonier, C.; Madigou, T.; Muñoz-Cueto, J. A.; Lareyre, J. J. & Kah, O. 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptor in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 135: 1-16.
- Lima, F. C. T.; Buckup, P. A.; Menezes, N. A.; Lucena, C. A. S.; Toledo-Piza, M. & Zanata, A. 2007. Família Characidae: gêneros *incertae sedis*. 44-62. **In:** Buckup, P. A.; Menezes, N. A. & Ghazzi, M. S. (Eds). 2007. *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Série Livros 23. Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 195p.
- Lima, F. C. T.; Malabarba, L. R.; Buckup, P. A.; Pezzi da Silva, J. F.; Vari, R. P.; Harold, A.; Benine, R.; Oyakawa, O. T.; Pavanelli, C. S.; Menezes, N. A.; Lucena, C. A.; Malabarba, M. C. S. L.; Lucena, Z. M. S. Reis, R. E.; Langeani, F.; Cassati, L.; Bertaco, V. A.; Moreira, C. & Lucinda, P. H. F. 2003. Genera incertae sedis in Characidae. **In:** Reis, R. E.; Kullander, S. O. & Ferraris, C. J. 2003. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Edipucrs. 742p.
- Lima, R. L. V. A.; Val-Sella, M. V. & Torquato, V. C. 1986. Organização e desenvolvimento das gôrnadas do dourado (*Salminus maxillosus* Val.) durante o ciclo reprodutivo. *Boletim Fisiológico Animal Universidade de São Paulo* 10: 139-154.
- Lima, R. V. A.; Bernardino, G.; Val-Sella, M. V.; Favo-de-Moraes, F.; Schemy, R. A. & Borella, M. I. 1991. Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Homberg, 1887) mantidos em cativeiro. *Boletim Técnico do CEPTA Pirassununga* 4 (1): 1-46.
- Lo Nostro, F. L.; Antoneli, F. N.; Quagio-Grassiotto, I. & Guerrero, G. A. 2004. Testicular interstitial cells and steroidogenic detection in the protogynous

- fish, *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae). *Tissue & Cell* 36: 221-231.
- Lowe-McConnell, R. H. 1999. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. EDUSP. 534p.
- Lucas, M. C. & Baras, E. 2001. *Migration of freshwater fishes*. Blackwell Science. 420p.
- Mancera, J. M. & Fuentes, J. 2006. Osmoregulatory action of hypophyseal hormones in teleosts. 393-417. **In:** Reinecke, M.; Zaccone, G. & Kappor, B. G. 2006. *Fish Endocrinology*. Science Publishers. volume 01. 440p.
- Martyniuk, C. J.; Gallant, N. S.; Marlatt, V. L.; Wiens, S. C.; Woodhouse, A. J. & Trudeau, V. L. 2006. Current perspectives on 17 β -estradiol (E₂) action and nuclear estrogen receptors (ER) in teleost fish. 625-663. **In:** Reinecke, M.; Zaccone, G. & Kappor, B. G. 2006. *Fish Endocrinology*. Science Publishers. volume 02. 871p.
- Mayer, I.; Rand-Weaver, M. & Borg, B. 1998. Effects of gonadectomy and steroids on plasma and pituitary levels of somatolactin in atlantic salmon, *Salmo salar*. *General and Comparative Endocrinology* 109: 223-231.
- Melo, R. G. 2006. Caracterização da expressão do RNAm das gonadotropinas de *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) ao longo do ciclo reprodutivo: efeitos do bloqueio reprodutivo. *Dissertação de Mestrado*. Universidade de Mogi das Cruzes. 58p.
- Mommsen, T. P. 2001. Paradigms of growth in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* (B) 129: 207-219.
- Moncaut, N.; Lo Nostro, F. & Maggese, M. C. 2003. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17 β . Effects on liver and gonads. *Aquatic Toxicology* 63: 127-137.
- Moreira, R. G. 1999. Esteróides gonadais, proteína, lipídios plasmáticos e hepáticos em relação ao ciclo reprodutivo do dourado *Salminus maxillosus* (Valenciennes, 1840) (Pisces Characiformes: Characidae) de ambiente natural. *Tese de Doutorado*. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 108p.
- Moreira, R. G.; Venturieri, R. L. L.; Mimura, O. M., 2002. Lipid and protein alteration in the liver and plasma of the migratory teleost *Salminus*

- maxillosus* during the reproductive cycle. *Journal Aquaculture in the Tropics* 17: 209-219.
- Moreira, R. M.; Venturieri, R. L. L.; Bernardino, G. & Mimura, O. M. 2000. Alterações sazonais hepáticas em *Salminus maxillosus* em ambiente natural. *Boletim Técnico do CEPTA Pirassununga* 13: 47-61.
- Mosconi, G.; Cardinaletti, G.; Carotti, M.; Palermo, F.; Soverchia, L. & Polzonetti-Magni, A. M. 2006. Neuroendocrine mechanisms regulating stress response in cultured teleost species. 693-720. **In:** Reinecke, M.; Zaccone, G. & Kappor, B. G. 2006. *Fish Endocrinology*. Science Publishers. volume 02. 871p.
- Mousa, M. A. & Mousa, S. A. 1999. Immunocytochemical study on the localization and distribution of the somatolactin cells in the pituitary gland and the brain of *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *General and Comparative Endocrinology* 113: 197-211.
- Mousa, M. A. & Mousa, S. A. 2000. Implication of somaolactin in the regulation of sexual maturation and spawning of *Mugil cephalus*. *Journal of Experimental Zoology* 287: 62-73.
- Moyle, P. B. & Cech, J. J. 2003. *Fishes. An introduction to ichthyology*. Prentice Hall, Upper Saddle River. New Jersey. 590p.
- Mylonas, C. C.; Magnus, Y.; Gissis, A.; Klebanov, Y. & Zohar, Y. 1997. Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass. *Journal of Fish Biology* 51: 234-250.
- Mylonas, C. C.; Sullivan, C. V. & Hinshaw, J. M. 1994. Thyroid hormones in brown trout (*Salmo trutta*) reproduction and early development. *Fish Physiology and Biochemistry* 13 (6): 485-493.
- Mylonas, C. C.; Woods, III L. C.; Thomas, P. & Zohar, Y. 1998. Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) during post-vitellogenesis, and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRHa-delivery systems. *General and Comparative Endocrinology* 110: 276-289.
- Nagahama, Y. & Kagawa, H. 1982. In vitro steroid production in the postovulatory follicles of the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, in response to salmon gonadotropin. *Journal of Experimental Zoology* 219: 105-109.

- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. 223-275. **In:** Hoar, W. S.; Randall, D. J. & Donaldson, E. M. 1983. *Fish physiology* vol. IX.483p.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *The International Journal of Developmental Biology* 38: 217-229.
- Nagahama, Y. 1997. $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62: 190-196.
- Nagahama, Y. 1999. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. **In:** *International Symposium on Reproductive Physiology of fish*, 6, Bergen. Proceedings. University of Bergen, Bergen. p: 211.
- Nagahama, Y. 2000. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. **In:** *International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, 6, Bergen. 1999. Proceedings. University of Bergen, Bergen. p:211.
- Naito, N.; Hyodo, S.; Okumoto, N.; Urano, A. & Nakai, Y. 1991. Differential production and regulation of gonadotropins (GtHI e GtHII) in the pituitary gland of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during ovarian development. *Cell & Tissue Research* 266: 457-467.
- Nakatani, K.; Agostinho, A. A.; Baumgartner, G.; Bialetzki, A.; Sanches, P.V.; Makrakis, M.C. & Pavanelli, C. 2001. *Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá: EDUEM, 378p.
- Narcizo, A. M.; Honji, R. M. & Moreira, R. G. 2007a. Caracterização da fecundidade de *Salminus hilarii* (Teleostei: Characidae) em ambiente natural, impactado e cativeiro. **In:** *X Congresso de Iniciação Científica*. Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo.
- Narcizo, A. M.; Honji, R. M.; Moreira, R. G. & Romagosa, E. 2007b. Caracterização da fecundidade de *Salminus hilarii* (Teleostei: Characidae) em ambiente natural, impactado e em cativeiro. **In:** *XVII Encontro Brasileiro de Ictiologia*. Itajaí-SC. Brasil. p:217.
- Nelson, J. S. 1994. *Fishes of the World*. 2nd Ed. New York. Wiley – Interscience. 600p.

- Nóbrega, R. H. & Guagio-Grassiotto, I. 2007. Morphofunctional changes in Leydig cells throughout the continuous spermatogenesis of the freshwater teleost fish, *Serrasalmus spilopleura* (Characiformes, Characidae): an ultrastructural and enzyme study. *Cell & Tissue Research* 329: 339-349.
- Nóbrega, R. H. 2006. Alterações do epitélio germinativo masculino, células endócrinas testiculares e células gonadotrópicas durante o ciclo reprodutivo de *Serrasalmus spilopleura* (Kner, 1859) e *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803). *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Campinas. 185p.
- Nóbrega, R. H.; Honji, R. M.; Quagio-Grassiotto, I. & Borella, M. I. 2006. Imuno-histoquímica das células FSH e LH durante o ciclo espermatogênico do bagre neotropical, *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae). In: *XXII Congresso Brasileiro de Anatomia/XXVII Congresso Chileno de Anatomía/VIII Congreso de Anatomía del Cono Sur*. Florianópolis, SC. p: 389.
- Norris, D. O. & Hobbs, S. L. 2006. The HPA axis and functions of corticosteroids in fishes. 721-765. In: Reinecke, M.; Zaccone, G. & Kappor, B. G. 2006. *Fish Endocrinology*. Science Publishers. volume 02. 871p.
- Nozaki, M.; Naito, N.; Swanson, P.; Dickhoff, W. W.; Nakai, Y.; Suzuki, K. & Kawauchi, H. 1990b. Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GtHI and GtHII cells in rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). *General and Comparative Endocrinology* 77: 358-367.
- Nozaki, M.; Naito, N.; Swanson, P.; Miyata, K.; Nakai, Y.; Oota, Y.; Suzuki, K. & Kawauchi, H. 1990a. Salmonid pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GtHI e GtHII. *General and Comparative Endocrinology* 77: 348-357.
- Olivereau, M. & Rand-Weaver, M. 1994. Immunocytochemical study of the somatolactin cells in the pituitary of pacific salmon, *Oncorhynchus nerka*, and *O. keta* at some stages of the reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 93: 28-35.
- Ono, M.; Takayama, Y.; Rand-Weaver, M.; Sakata, S.; Yasunaga, T.; Noso, T. & Kawauchi, H. 1990. cDNA cloning of somatolactin a new pituitary

- protein related to growth hormonal and prolactin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 4330-4334.
- Pandolfi, M.; Lo Nostro, F. L.; Shimizu, A.; Pozzi, A. G.; Meijide, F. J.; Vazquez, G. R. & Maggese. 2006. Identification of immunoreactive FSH and LH cells in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* during the ontogeny and sexual differentiation. *Anatatomy and Embryology* 211: 355-365.
- Pandolfi, M.; Paz, D. A.; Maggese, C.; Meijide, F. J. & Vissio, P. 2001b. Immunocytochemical localization of different cell types in the adenohypophysis of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840). *Biocell* 25 (1): 35-42.
- Pandolfi, M.; Paz, D. A.; Maggese, C.; Ravaglia, M. & Vissio, P. 2001a. Ontogeny of immunoreactive somatolactin, prolactin and growth hormone secretory cells in the developing pituitary gland of *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Anatomy and Embryology* 203: 461-468.
- Pang, Y & Ge, W. 2002. Gonadotropin and activin enhance maturational competence of oocytes in the zebrafish (*Danio rerio*). *Biology of Reproduction* 66: 259-265.
- Parenti, L. R. & Grier, H. J. 2004. Evolution and phylogeny of gonadal morphology in bony fishes. *Integrative & Comparative Biology* 44: 333-348.
- Parreira, S. F. & Borella, M. I. 1996. Ultrastructure of gonadotrops in the pituitary gland of the *Prochilodus scrofa*. *Brazilian Journal of Morphology*. 13 (1): 126.
- Parreira, S. F. 1998. Células gonadotrópicas de curimbatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Pisces, teleostei): estudo ultra-estrutural e imunohistoquímico. *Dissertação de Mestrado*. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo. 74p.
- Peter, R. E. & Yu, K. L., 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basics applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7: 173-197.
- Planas, J. V.; Athos, J.; Goetz, F. W. & Swanson, P. 2000. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and

- luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish. *Biology of Reproduction* 62: 1262-1269.
- Planas, J. V.; Swanson, P.; Rand-Weaver, M. & Dickhoff, W. W. 1992. Somatolactin stimulates in vitro gonadal steroidogenesis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology* 87: 1-5.
- Porto-Foresti, F.; Castilho-Almeida, R. B. & Foresti, F. 2005. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). 105-120. In: Baldisserotto, B. & Gomes, L. C. (Org). 2005. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Editora UFSM. Santa Maria. 470p.
- Powell, J. F. F.; Standen, E. M.; Carolsfeld, J.; Borella, M. I.; Gazola, R.; Fischer, W. H.; Park, M.; Craig, A. G.; Warby, C. M.; Rivier, J. E.; Val-Sella, M. V. & Sherwood, N. M. 1997. Primary structure of three forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the pacu brain. *Regulatory Peptides* 68: 189-195.
- Powell, M. L.; Kavanaugh, S. & Sower, S. A. 2006. Identification of a functional corpus luteum in the atlantic hagfish *Myxine glutinosa*. *General and Comparative Endocrinology* 148: 95-101.
- Pudney, J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microscopy Research and Technique* 32: 459-497.
- Quesada, J.; Lozano, M. T.; Ortega, A. & Agulleiro, B. 1988. Immunocytochemical and ultrastructural characterization of the cell types in the adenohypophysis of *Sparus aurata* L. (Teleost). *General and Comparative Endocrinology* 72: 209-225.
- Rand-Weaver, M.; Noso, T.; Muramoto, K. & Kawauchi. 1991a. Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. *Biochemistry* 30: 1509-1515.
- Rand-Weaver, M.; Pottinger, T. G. & Sumpter, J. P. 1993. Plasma somatolactin concentrations in salmonid fish are elevated by stress. *Journal of Endocrinology* 138 (3): 509-515.
- Rand-Weaver, M.; Baker, B. J. & Kawauchi, H. 1991b. Cellular localization of somatolactin in the pars intermedia of teleost fishes. *Cell & Tissue Research* 263: 207-215.

- Rendon, C.; Rodríguez-Gómez, F. J.; Muñoz-Cueto, J. A.; Piñuela, C. & Sarasquete, C. 1997. An immunocytochemical study of pituitary cells of the senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup 1858). *Histochemical Journal* 29: 813-822.
- Rocha, M. J. & Rocha, E. 2006. Morphofunctional aspects of reproduction from synchronous to asynchronous fishes – An overview. 570-624. In: Reinecke, M.; Zaccone, G. & Kappor, B. G. 2006. *Fish Endocrinology*. Science Publishers. volume 02. 871p.
- Rodrigues, P. G. C.; Camargo, C. & Moreira, R. G. 2006. Protein and lipids storage strategy of *Salminus hilarii* in the different sites of the upper Tietê River. In: 41st Congress of the Brazilian Physiological Society. Ribeirão Preto-SP, Brasil. p: 206.
- Rodríguez-Gómez, F. J.; Rendón-Unceta, M. C.; Piñuela, C.; Muñoz-Cueto, J. A.; Jiménez-Tenorio, N. & Serasquete, C. 2001. Immunocytohistochemical characterization of pituitary cells of the bluefin tuna *Thunnus thynnus* L. *Histology and Histopathology* 16: 443-451.
- Romagosa, E. 1998. Desenvolvimento gonadal (morfologia; ultra-estrutura) e indução da reprodução do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) em cativeiro. Vale do Paraíba, São Paulo. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal de São Carlos. 218p.
- Romagosa, E.; Batlouni, S. R.; Borella, M. I. & Leonardo, A. F. G. 2005. Involução dos folículos pós-ovulatórios em *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pisces, Teleostei). *Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo* 31 (2): 129-135.
- Romagosa, E.; Borella, M. I.; Narahara, M. Y. & Fenerich-Verani, N. 2002. Light and electron microscopy oogenesis in matrinxã, *Brycon cephalus*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 34 (4): 425-431.
- Sakamoto, T. & McCormick, S. D. 2006. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *General and Comparative Endocrinology* 147: 24-30.
- Santos, H. B.; Rizzo, E.; Bazzoli, N.; Sato, Y. & Moro, L. 2005. Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lütken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. *Journal of Fish Biology* 67: 1446-1459.

- Sato, Y.; Fenerich-Verani, N.; Nuñez, A. P. O.; Godinho, H. P. & Verani, J. R. 2003. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. 229-274. **In:** Godinho, H. P. & Godinho, A. L. (Org). 2003. *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte. PUC-Minas. 468p.
- Schreiber, A. M. & Specker, J. L. 1999. Early larval development and metamorphosis in the summer flounder: changes in per cent whole-body water content and effects of altered thyroid status. *Journal of Fish Biology* 55: 148-157.
- Schulz, R. W.; Bogerd, J.; Bosma, P. T.; Peute, J.; Rebers, F. E. M.; Zandbergen, M. A. & Goos, H. J. Th. 1995. Physiological, morphological and molecular aspects of gonadotropins in fish with special reference to african catfish. **In:** *International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Austin. Proceedings. University of Austin, Austin. p: 2-5.
- Segura-Noguera, M. M.; Laiz-Carrión, R.; Martín del Río, M. P. & Mancera, J. M. 2000. An immunocytochemical study of the pituitary gland of the white seabream (*Diplodus sargus*). *The Histochemical Journal* 32: 733-742.
- Shimizu, A.; Sakai, T.; Nashida, K. & Honda, H. 2003a. Universal antisera for immunocytochemical identification of two different gonadotrophs in acanthopterygian fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* 29: 275-287.
- Shimizu, A.; Tanaka, H. & Kagawa, H. 2003b. Immunocytochemical applications of specific antisera raised against synthetic fragment peptides of mummichog GtH subunits: examining seasonal variations of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in the mummichog and applications to other acanthopterygian fishes. *General and Comparative Endocrinology* 132: 35-45.
- Silva, F. S. D.; Deus, J. R. M. & Hilsdorf, A. W. S. 2006. The upper reached ichthyofauna of the Tietê River, São Paulo, Brazil: aspects of their diversity and conservation. *Biodiversity and Conservation* 15: 3569-3577.
- Somoza, G. M.; Lescheid, D. W.; Miranda, L. A.; Lo Nostro, F. L.; Magliulo-Cepriano, L.; Montaner, A. D.; Schreiber, M. P.; Rivier, J. E. & Sherwood, N. M. 2002. Expression of pejerrey gonadotropin-releasing hormone in three Orders of fish. *Biology of Reproduction* 67: 1864-1871.

- Somoza, G. M.; Stéfano, A.; D'Eramo, J. L.; Canosa, L. F. & Fridman, O. 1994. Immunoreactive GnRH suggesting a third form of GnRH in addition to cllGnRH and sGnRH in the brain and pituitary gland of *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *General and Comparative Endocrinology* 94: 44-52.
- Sower, S. A.; Moriyama, S.; Kasahara, M.; Takahashi, A.; Nozaki, M.; Uchida, K.; Dahlstrom, J. M. & Kawauchi, H. 2006. Identification of sea lamprey GtH β -like cDNA and its evolutionary implications. *General and Comparative Endocrinology* 148: 22-32.
- Suzuki, K.; Kawauchi, H. & Nagahama, Y. 1988a. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *General and Comparative Endocrinology* 71: 292-301.
- Suzuki, K.; Kawauchi, H. & Nagahama, Y. 1988b. Isolation and characterization of subunits from two distinct salmon gonadotropins. *General and Comparative Endocrinology* 71: 302-306.
- Swanson, P.; Dickey, J. T. & Campbell, B. 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry* 28: 53-59.
- Takahashi, E. L. H. 2006. Ciclo reprodutivo da tabarana *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) (Characidae, Salmininae) na região do baixo Rio Sorocaba, SP. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual Paulista. Centro de Aquicultura. Jaboticabal. 58p.
- Takahashi, E. L. H.; Villares, G. A.; Goiten, R. & Nakaghi, L. S. O. 2007. Desenvolvimento ovariano da tabarana *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) no rio Sorocaba, SP. **In:** *XVII Encontro Brasileiro de Ictiologia*. Itajaí-SC. Brasil. p: 202.
- Takei, Y. & Loretz, C. A. 2006. Endocrinology. 271-318. **In:** Evans, D. H. & Claiborne, J. B. 2006. *The Physiology of Fish*. 3ed. Taylor & Francis Group. 601p.
- Toubeau, G.; Poilve, A.; Baras, E.; Nonclercq, D.; De Moor, S.; Beckers, J. F.; Dessy-Doize, C. & Heuson-Stiennon, J. A. 1991. Immunocytochemical study of cell type distribution in the pituitary of *Barbus barbus* (Teleostei, Cyprinidae). *General and Comparative Endocrinology* 83: 35-47.

- Tsai, P. S. 2006. Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: structure, function and evolution. *General and Comparative Endocrinology* 148: 48-53.
- Tyler, C. R. & Sumpter, J. P. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6: 287-318.
- Vazzoler, A. E. A. M. & Menezes, N. A. 1992. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). *Revista Brasileira de Biologia* 52 (4): 627-640.
- Vazzoler, A. E. A. M. 1981. *Manual de métodos para estudos biológicos de populações de peixes: reprodução e crescimento*. Brasília CNPq. 108p.
- Vazzoler, A. E. A. M. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. EDUEM, Maringá. 169p.
- Venturieri, R. 1997. Determinação de esteróides e eletrólitos plasmáticos em fêmeas adultas de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) Pisces, Teleostei durante a maturação gonadal. *Tese de Doutorado*. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 133p.
- Veríssimo-Silveira, R. 2003. Ciclo reprodutivo e cinética da espermatogênese do dourado (*Salminus maxillosus* Valenciennes, 1849). *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual Paulista. Centro de Aquicultura. 60p.
- Veríssimo-Silveira, R.; Gusmão-Pompiani, P.; Vicentini, C. A. & Quagio-Grassiotto. 2006. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). *Acta Zoologica* 87: 305-313.
- Vieira, V. L. & Lopes, P. R. S. 2005. Aspectos da biologia, reprodução e manejo de *Hoplias malabaricus* (traíra). 287-301. In: Baldissotto, B. & Gomes, L. C. (Org). 2005. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Editora UFSM. Santa Maria. 470p.
- Vissio, P. G.; Somoza, G. M.; Maggese, M. C.; Paz, D. A. & Strüssmann. 1997. Structure and cell type distribution in the pituitary gland of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Fisheries Sciences* 63 (1): 64-68.
- von Ihering, R. 1929. *Da vida dos peixes. Ensaios e cenas de pescarias*. Editora Proprietária. Comp. Melhoramentos de São Paulo. 150p.
- Wallace, R. A. & Selman, K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleost. *American Zoologist* 21: 325-343.

- Weingartner, M. & Zaniboni-Filho, E. 2005. Dourado. **In:** Baldiserotto, B. & Gomes, L. C. (Org). 2005. *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*. Editora UFSM. Santa Maria. 468p.
- Weltzien, F. A.; Andersson, E.; Andersen, Ø.; Shalchian-Tabrizi, K. & Norberg, B. 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* 137: 447-277.
- West, G. 1990. Methods of assessing ovarian development in fish: a review. *Australian Journal Marine & Freshwater Research* 41: 199-222.
- White, A. & Fletcher, T. C. 1984. Radioimmunoassay of serum cortisol in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *General and Comparative Endocrinology* 53: 410-417.
- Wootton, R. J. 1990. *Ecology of teleost fishes*. London – New York. Chapman and Hall. 404p.
- Yan, H. Y. & Thomas, P. 1991. Histochemical and immunocytochemical identification of the pituitary cell types in three scianid fishes: atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*), spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) and red drum (*Sciaenops ocellatus*). *General and Comparative Endocrinology* 84: 389-400.
- Yaron, A.; Gur, G.; Melamed, P.; Rosenfeld, H.; Levavi-Sivan, B. & Elizur, A. 2001. Regulation of gonadotropin subunit genes in tilapia. *Comparative Biochemistry and Physiology (B)* 129: 489-502.
- Yaron, Z. & Sivan, B. 2006. Reproduction. 243-386. **In:** Evans, D. H. & Claiborne, J. B. 2006. *The physiology of fish*. Taylor & Francis. 3ed. 601p.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical analysis*. New Jersey. Prentice Hall. 718p.
- Zavala-Camin, L. A. 2004. *O planeta água e seus peixes*. Edição do Autor. 326p.
- Zohar, Y. & Mylonas, C. C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99-136.

8 – Tabelas

Tabela 01: *Salminus hilarii* – Anticorpos primários utilizados na hipófise de *Salminus hilarii*.

Anticorpos utilizados	Fonte	Código	Diluição
Chum salmon β -FSH	Dr. H. Kawauchi	8510	1:1000
Chum salmon β -LH	Dr. H. Kawauchi	8506	1:1000
Chum salmon PRL	Dr. H. Kawauchi	8206	1:1000
Chum salmon SL	Dr. H. Kawauchi	8906	1:2000
Chum salmon GH	Dr. H. Kawauchi	8502	1:1000
Chum salmon β -FSH	Dr. A. Shimizu	2684	1:4000
Chum salmon β -LH	Dr. A. Shimizu	2686	1:4000
Mummichog β -LH	Dr. H. Kawauchi	299	1:1000
Mummichog β -FSH	Dr. H. Kawauchi	003	1:1000
Mummichog α -GtH	Dr. H. Kawauchi	616	1:1000
Carp α - β -GtH	Dr. J. Mancera	N/F	1:1000
Carp β -GtH	Dr. J. Mancera	N/F	1:3000

Todos os anticorpos utilizados neste trabalho foram doados gentilmente pelos seus respectivos autores.
N/F: não fornecido.

Tabela 02: *Salminus hilarii* – Distribuição morfométrica e ponderal por estágio de maturação gonadal. Grupo experimental 01 (ambiente natural).

Grupo Experimental 01 - Ambiente Natural (Rio)					
Sexo	Estádio de maturação	N	Comprimento total (cm) min-max	Comprimento total (cm) média	Massa corpórea (g) média
Fêmeas	Repouso	5	39,00 - 45,50	41,54	734,00
	Maturação Inicial	1	36,50	36,50	370,00
	Maduro	10	25,00 - 47,50	42,37	946,50
	Regressão/Esgotado	6	32,00 - 52,50	42,25	879,17
Sub-total (Fêmeas)		22	25,00 - 52,50	41,88	853,60
Sexo	Estádio de maturação	N	Comprimento total (cm) min-max	Comprimento total (cm) média	Massa corpórea (g) média
Machos	Repouso	2	24,00 - 30,50	27,25	190,00
	Regressão	1	35,50	35,50	110,00
Sub-total (Machos)		3	24,00 - 35,50	30,00	260,00
Total de exemplares		25	24,00- 52,50	40,50	782,40

Tabela 03: *Salminus hilarii* – Distribuição morfométrica e ponderal por estágio de maturação gonadal. Grupo experimental 02 (ambiente impactado por barragem).

Grupo Experimental 02 - Ambiente Natural (Barragem)					
Sexo	Estádio de maturação	N	Comprimento total (cm) min-max	Comprimento total (cm) média	Massa corpórea (g) média
Fêmeas	Repouso	6	32,50 - 38,00	35,83	437,17
	Maturação Inicial				
	Maduro	10	32,50 - 49,80	39,68	760,20
	Regressão/Esgotado				
Sub-total (Fêmeas)		16	32,50 - 49,80	38,24	639,06
Sexo	Estádio de maturação	N	Comprimento total (cm) min-max	Comprimento total (cm) média	Massa corpórea (g) média
Machos	Repouso	2	29,00 - 30,50	29,80	282,50
	Regressão	5	26,00 - 32,00	28,80	248,00
Sub-total (Machos)		7	26,00 - 32,00	29,10	257,86
Total de exemplares		23	26,00 - 49,80	35,45	523,04

Tabela 04: *Salminus hilarii* – Distribuição morfométrica e ponderal por estágio de maturação gonadal. Grupo experimental 03 (ambiente de cativeiro).

Grupo Experimental 03 - Ambiente de cativeiro (Piscicultura)					
Sexo	Estádio de maturação	N	Comprimento total (cm) min-max	Comprimento total (cm) média	Massa corpórea (g) média
Fêmeas	Repouso	5	34,00 - 37,00	35,60	477,60
	Maturação Inicial	5	35,00 - 37,50	36,20	577,00
	Maturação Avançada	7	31,50 - 39,50	34,64	555,71
	Regressão/Esgotado	6	32,50 - 37,70	34,87	518,00
Sub-total (Fêmeas)		23	31,50 - 39,50	35,25	533,52
Sexo	Estádio de maturação	N	Comprimento total (cm) min-max	Comprimento total (cm) média	Massa corpórea (g) média
Machos					
Sub-total (Machos)					
Total de exemplares		23	31,50 - 39,50	35,25	533,52

Tabela 05: *Salminus hilarii* – Distribuição mensal dos estádios do ciclo reprodutivo por grupo experimental.

Ambiente	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Rio	Regressão Esgotado	Repouso				Maturação Inicial			Maduro		Regressão Esgotado	
Barragem			Repouso							Maduro		
Cativeiro	Regressão Esgotado		Repouso				Maturação Inicial		Maturação avançada			

Tabela 06: *Salminus hilarii* – Descrição estatística do Índice gonadosomático (IGS) por sexo, por estágio de maturação gonadal e por grupo experimental (01 – ambiente natural; 02 – ambiente impactado por barragem; 03 – ambiente de cativeiro). Média $\pm$ erro padrão.

		Grupo Experimental 01		Grupo Experimental 02		Grupo Experimental 03	
Sexo	Estádio de Maturação	N	IGS (média $\pm$ erro padrão)	N	IGS (média $\pm$ erro padrão)	N	IGS (média $\pm$ erro padrão)
Fêmeas	Repouso	5	0,99 $\pm$ 0,04 ^a	6	0,72 $\pm$ 0,06 ^b	5	0,68 $\pm$ 0,08 ^b
	Maturação Inicial	1	1,38			5	1,71 $\pm$ 0,18
	Maduro/Maturação Avançada	10	10,80 $\pm$ 1,66 ^{**}	10	9,97 $\pm$ 0,92 ^{**}	7	9,96 $\pm$ 1,05 ^{**}
	Regressão/Esgotado	6	1,95 $\pm$ 0,12 ^a			6	8,45 $\pm$ 1,88 ^{**b}
Sexo	Estádio de Maturação	N	IGS (média $\pm$ erro padrão)	N	IGS (média $\pm$ erro padrão)	N	IGS (média $\pm$ erro padrão)
Machos	Repouso	2	0,93 $\pm$ 0,47	2	0,64 $\pm$ 0,20		
	Maduro			5	5,13 $\pm$ 0,58		
	Regressão	1	1,12				

^{a,b} Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo estágio e ambientes diferentes;

* Símbolos diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo ambiente e estádios diferentes.

Tabela 07: *Salminus hilarii* – Número de exemplares capturados (Nº total) e número de hipófises utilizadas nas análises histoquímica e imuno-histoquímica por estágio de maturação gonadal e grupo experimental. Comprimento total (L_t) e massa corpórea total (W_t) das fêmeas utilizadas.

Ambiente	Estádio de maturação	Nº (total) de exemplares	Nº de hipófise utilizada	L _t (cm) média	W _t (g) média
Rio	Repouso	05	01	44,50	840
	Maturação Inicial	01			
	Maduro	10	04	42,55	950
	Regressão/Esgotado	6	02	47,50	1330
Barragem	Repouso	6	02	35,25	442
	Maturação Inicial				
	Maduro	10	02	38,00	705
	Regressão/Esgotado				
Cativeiro	Repouso	5	02	35,25	454
	Maturação Inicial	5	02	36,25	585
	Maturação Avançada	7	03	35,67	623
	Regressão/Esgotado	6	02	36,85	648

Tabela 08: *Salminus hilarii* – Porcentagem de células marcadas com anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH) por grupo experimental e estágio de maturação gonadal.

Ambiente	Estádio de Maturação	Nº de animais	Nº de imagens	% de células marcadas (média ± erro padrão)
Rio	Repouso	01	05	10,17 ± 0,73 ^a
	Maturação Inicial			
	Maduro	03	15	9,38 ± 1,15
	Regressão/Esgotado	02	10	13,19 ± 1,49 ^a
Barragem	Repouso	02	10	17,52 ± 1,83 ^{*b}
	Maturação Inicial			
	Maduro	02	10	11,12 ± 2,29 ^{**}
	Regressão/Esgotado			
Cativeiro	Repouso	02	10	16,20 ± 1,44 [*]
	Maturação Inicial	02	10	11,43 ± 1,38 ^{**}
	Maturação Avançada	02	10	9,25 ± 1,04 ^{**}
	Regressão/Esgotado	02	10	4,72 ± 0,66 ^{***b}

^{a,b} Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo estágio e ambientes diferentes;

* Símbolos diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo ambiente e estádios diferentes.

Tabela 09: *Salminus hilarii* – Porcentagem de células marcadas com anti-somatolactina de salmão (sSL) por grupo experimental e estágio de maturação gonadal.

Ambiente	Estádio de Maturação	Nº de animais	Nº de imagens	% de células marcadas (média ± erro padrão)
Rio	Repouso	01	05	10,99 ± 0,78 ^a
	Maturação Inicial			
	Maduro	01	05	19,83 ± 0,42 ^{**a}
	Regressão/Esgotado	01	05	10,41 ± 1,23 ^a
Barragem	Repouso	02	10	17,19 ± 0,95 ^b
	Maturação Inicial			
	Maduro	02	10	28,93 ± 4,15 ^{**}
	Regressão/Esgotado			
Cativeiro	Repouso	01	05	17,70 ± 1,47 ^{*b}
	Maturação Inicial	02	10	23,25 ± 0,97
	Maturação Avançada	01	05	33,91 ± 5,85 ^{**b}
	Regressão/Esgotado	01	05	27,08 ± 4,37 ^b

^{a,b} Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo estágio e ambientes diferentes;

* Símbolos diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo ambiente e estádios diferentes.

Tabela 10: *Salminus hilarii* – Concentração plasmática (pg/ml) de esteróides gonadais (média $\pm$ erro padrão), por grupo experimental por estágio de desenvolvimento gonadal. Número de fêmeas (N); estradiol (E_2); testosterona (T) e 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP).

Ambiente	Estádio de Maturação	N	E_2	N	T	N	17α -OHP
Rio	Repouso	05	$84,50 \pm 12,18^*$	04	$96,75 \pm 16,78$	04	$85,00 \pm 15,00^a$
	Maturação Inicial	01	285,51	01	195,80	01	100,00
	Maduro	09	$468,17 \pm 108,71^{**}$	06	$230,66 \pm 57,44$	07	$198,57 \pm 33,55^a$
	Regressão/Esgotado	06	$162,77 \pm 45,49^{*a}$	05	$109,39 \pm 30,18$	06	$222,00 \pm 48,40^a$
Barragem	Repouso	06	$81,54 \pm 15,89^*$	06	$62,22 \pm 25,40^*$	03	$133,33 \pm 33,33^b$
	Maturação Inicial						
	Maduro	09	$397,05 \pm 60,04^{**}$	08	$181,63 \pm 38,77^{**}$	10	$217,00 \pm 41,52^a$
	Regressão/Esgotado						
Cativeiro	Repouso	03	$36,03 \pm 7,75$	04	$125,69 \pm 32,50$	04	$432,50 \pm 131,17^b$
	Maturação Inicial	02	$105,15 \pm 45,12$	05	$45,01 \pm 8,48^*$	05	$360,00 \pm 76,15$
	Maturação média	03	$1375,52 \pm 302,74^*$	02	$126,80 \pm 36,48$	02	390
	Maturação Avançada	03	$168,25 \pm 32,22$	04	$136,58 \pm 51,98$	04	$467,50 \pm 107,73^b$
	Regressão/Esgotado	05	$27,34 \pm 3,36^b$	06	$89,24 \pm 14,27$	05	$595,00 \pm 86,05^b$

^{a,b} Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo estágio e ambientes diferentes;

* Símbolos diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo ambiente e estádios diferentes

Tabela 11: *Salminus hilarii* – Coeficientes de variação intraensaio para os esteróides gonadais: estradiol (E₂); testosterona (T) e 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP).

	N	Estradiol	N	Testosterona	N	Progesterona
Intraensaio	19	0,98 – 23,71	25	2,21 – 27,44	45	0,58 – 29,05

9 – Figuras

Figura 01

A

B

C

D

E

F

G

Figura 01: *Salminus hilarii* – Material biológico e ambientes utilizados no presente trabalho para formar os grupos experimentais. **A)** *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characiformes). **B,C)** Rio Tietê, ponto de coleta do grupo experimental 01 (ambiente natural). **B)** Trecho do rio com água corrente (ambiente lótico). **C)** Detalhe na captura dos animais. Arte de pesca: vara e isca viva (pesca artesanal). **D,E)** Rio Tietê, ponto de coleta do grupo experimental 02 (ambiente impactado por barragem). **D)** Barragem de Ponte Nova. **E)** Detalhe do Rio Tietê, continuação deste Rio à jusante da barragem de Ponte Nova (ambiente impactado por barragem). Arte de pesca: vara e isca viva e tarrafas. **F,G)** Viveiros da Piscicultura da Barragem de Ponte Nova, Salesópolis – SP (ambiente de cativeiro). **F)** Local de estocagem dos animais do grupo experimental 03. **G)** Detalhe do viveiro da Piscicultura da Barragem de Ponte Nova, utilizado no presente projeto (100m²). A captura dos animais deste grupo foi realizada com tarrafas e rede de arrasto.

Figura 02: *Salminus hilarii* – Área de abrangência do presente projeto, ponto de coleta 01 (Rio Tietê, ambiente lótico), ponto de coleta 02 (saída da água da Barragem de Ponte Nova, ambiente impactado) e ponto de coleta 03 (Piscicultura de Ponte Nova, ambiente de cativeiro).

Figura 03: *Salminus hilarii* – A hipófise da tabarana. **A)** Vista dorsal da região cefálica da tabarana, apresentando o encéfalo (seta azul) e a hipófise (seta vermelha). **B)** Esquema da posição de captura de imagens nas reações imuno-histoquímicas para a avaliação quantitativa. Barra: 300µm. “Pars intermedia” (PI); “rostral pars distalis” (RPD); “proximal pars distalis” (PPD). Anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH).

Figura 04: *Salminus hilarii* – Diagrama de dispersão e parâmetros estimados da equação entre os dados de comprimento total (L_t) e massa corpórea total (W_t). Exemplares capturados no ambiente natural (grupo experimental 01). N = 25.

Figura 05: *Salminus hilarii* – Diagrama de dispersão e parâmetros estimados da equação entre os dados de comprimento total (L_t) e massa corpórea total (W_t). Exemplares capturados no ambiente impactado por barragens (grupo experimental 02). N = 23.

Figura 06: *Salminus hilarii* – Diagrama de dispersão e parâmetros estimados da equação entre os dados de comprimento total (L_t) e massa corpórea total (W_t). Exemplares capturados no ambiente de cativeiro (grupo experimental 03). N = 23.

Figura 07: *Salminus hilarii* – Aspecto macroscópico de ovários de tabarana. **A)** Ovários no estágio repouso (seta azul). **B)** Ovários no estágio maturação inicial (seta azul). **C)** Ovários no estágio maduro (seta azul). **D)** Ovários no estágio regressão/esgotado (seta azul). **E)** Detalhe macroscópico de ovários de tabarana em animais coletados no ambiente natural no estágio maduro. **F)** Detalhe macroscópico de ovários de tabarana em animais coletados no cativeiro no estágio maturação avançada. Notar a diferença de coloração nos ovários entre os grupos experimentais (E-F). **A-E):** Exemplos capturados no ambiente natural. **F):** Exemplo capturado no cativeiro.

Figura 08: *Salminus hilarii* – Índice gonadossomático (IGS), por estágio de maturação gonadal e por grupo experimental. Valores de IGS apenas para as fêmeas. ^{a,b} Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo estágio e ambientes diferentes; * Símbolos diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo ambiente e estágios diferentes.

Figura 09

Figura 09: *Salminus hilarii* – Secções histológicas apresentando as diferentes fases de desenvolvimento oocitário de tabaranas coletadas no ambiente natural (grupo 01). Reações histoquímicas. **A)** Oócitos na fase cromatina-nucléolo (oogônias). Observa-se que as oogônias estão reunidas em ninhos (seta). **B)** Oócitos na fase perinucleolar. Oócitos numa fase perinucleolar mais inicial (cabeça de seta) e numa fase mais avançada (seta). **C)** Detalhe do oócito na fase perinucleolar mais avançada, evidenciando o núcleo (N) com múltiplos nucléolos na periferia (setas). **D)** Detalhe do oócito perinucleolar mais inicial e uma fina camada folicular (seta). **E)** Detalhe do oócito perinucleolar mais avançada. Nota-se um epitélio folicular mais espesso (seta). **F)** Oócitos na fase cortical alveolar, podendo-se notar a presença de deposição lipídica na periferia do oócito (setas) e a zona radiata (asterisco). **G)** Oócitos na fase vitelogênica (com núcleo central). **H)** Oócitos na fase madura (setas). Pode observar o núcleo desorganizado (cabeça de seta) e a micrópila (círculo vermelho). **A-H:** Hematoxilina e Eosina. **A,B,D,E,F:** Barra = 100µm. **C:** Barra = 20µm. **G,H:** Barra = 300µm.

Figura 10

Figura 10: *Salminus hilarii* – Continuação das secções histológicas apresentando as diferentes fases de desenvolvimento oocitário de tabaranas coletadas no ambiente natural (grupo 01). Reações histoquímicas. **A)** Detalhe de um oócito, evidenciando a micrópila (seta) e as estrias radiais da zona radiata (cabeça de seta). **B)** Detalhe dos oócitos na fase vitelogênica, evidenciando o citoplasma repleto de grânulos de vitelo (GV) e o envoltório folicular: zona radiata (cabeça de seta) e camada folicular (seta). **C)** Detalhe de um oócito na fase madura, evidenciando os grânulos de vitelo (GV), núcleo desorganizado (círculo) e nucléolos na periferia do núcleo (cabeça de seta). **D)** Oócitos na fase vitelogênica (cabeça de seta) e folículo pós-ovulatório (seta). **E)** Oócitos atrésicos evidenciando as características de início de atresia. Notar a deformação (espessamento) da zona radiata (cabeça de seta) e desorganização dos grânulos de vitelo (seta). **F)** Detalhe de um oócito atrésico (seta) em um estágio mais avançado de reabsorção. **A-F:** Hematoxilina e Eosina. **A:** Barra = 20µm. **B:** Barra = 50µm. **C,F:** Barra = 100µm. **D,E:** Barra = 300µm.

Figura 11: *Salminus hilarii* – Secções histológicas apresentando as diferentes escalas de maturação gonadal de tabaranas coletadas no ambiente natural. Reações histoquímicas. **A)** Aspecto microscópico de um lobo de ovário no estágio repouso. **B)** Aspecto microscópico de um lobo de ovário no estágio maturação inicial. **C)** Aspecto microscópico de um lobo de ovário no estágio maduro. **D)** Aspecto microscópico de um lobo de ovário no estágio regressão/esgotado. **A-D:** Hematoxilina e Eosina. **A,C,D:** Barra = 300µm. **B:** Barra = 100µm.

Figura 12: *Salminus hilarii* – Aspecto macroscópico de testículos de tabarana. **A)** Testículos no estágio regressão (seta azul). **B)** Testículos no estágio maduro (seta azul). **C)** Detalhe macroscópico de testículos de tabarana no estágio regressão. **D)** Detalhe macroscópico de testículos de tabarana no estágio maduro. **A-D:** Exemplos capturados no ambiente natural (Rio Tietê, grupo experimental 01).

Figura 13: *Salminus hilarii* – Índice gonadosomático (IGS), por estágio de maturação gonadal e por grupo experimental. Valores de IGS apenas para os machos.

Figura 14

Figura 14: *Salminus hilarii* – Secções histológicas apresentando as diferentes fases de desenvolvimento testicular e as diferentes escalas de maturação gonadal de tabaranas coletadas no ambiente natural (grupo 01). Reações histoquímicas. **A)** Células testiculares da tabarana: espermatogônias (SG), espermatócitos (SC) e espermátides (ST). **B)** Ductos testiculares com espermatozóides (SZ) e cistos. **C)** Célula de Sertoli (S), notar os finos prolongamentos dessa célula (cabeça de seta), espermatogônias (SG) e espermátides (ST). **D)** Tecido intersticial (TI), evidenciando as células de Leydig (asterisco). **E)** Epitélio germinativo descontínuo (EGD) e espermatozóides (SZ). **F)** Epitélio germinativo contínuo (EGC), ducto (D) e tecido intersticial (TI). **G)** Aspecto microscópico de secção transversal de testículo, evidenciando os ductos com espermatozóides residuais (cabeça de seta). Estádio regressão. **H)** Aspecto microscópico de secção transversal de testículo, evidenciando os ductos (D) repletos de espermatozóides (SZ). Estádio maduro. **A-H:** Hematoxilina e Eosina. **A,C,D:** Barra = 20µm. **B,E,F:** Barra = 100µm. **G,H:** Barra = 300µm.

Figura 15: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações histoquímicas. **A-B)** “pars intermedia” (PI), “rostral pars distalis” (RPD), “proximal pars distalis” (PPD) e neurohipófise (NH). **C,D)** Região da adeno-hipófise: “rostral pars distalis”. **C)** Células produtoras de adrenocorticotropina (ACTH) (cabeça de seta). Observa-se um ramo da neuro-hipófise (NH). **D)** Células produtoras de prolactina (PRL) (cabeça de seta). **A,C,D:** Tricrômio de Mallory. **B:** Ácido Periódico de Schiff (PAS). **A,B:** Barra = 300µm. **C,D:** Barra = 20µm.

Figura 16: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações histoquímicas. **A)** Região da adeno-hipófise, “*rostral pars distalis*” apresentando as células produtoras de prolactina (seta) e as células produtoras de adrenocorticotropina (cabeça de seta). **B,C,D,E,F)** Região da adeno-hipófise: “*proximal pars distalis*”. **B)** Células produtoras de hormônio de crescimento (cabeça de seta). **C)** Células produtoras de gonadotropina (cabeça de seta). Reação positiva com Ácido periódico de Schiff (PAS). **D,E)** Células produtoras de gonadotropina (cabeça de seta). **F)** Região da adeno-hipófise, “*proximal pars distalis*” apresentando as células produtoras de hormônio de crescimento (seta) e as células produtoras de gonadotropinas (cabeça de seta). Neuro-hipófise (NH). **A,B,D,E,F:** Tricrômio de Mallory. **C:** Ácido Periódico de Schiff (PAS). **A-F:** Barra = 20µm.

Figura 17: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações histoquímicas. **A-D)** Região da adeno-hipófise: “*pars intermedia*” (PI). **A)** Células produtoras de melanotropina (cabeça de seta). **B)** Células produtoras de somatotropina (cabeça de seta). **C)** Células produtoras de somatotropina (cabeça de seta). Reação positiva com Ácido Periódico de Schiff. **D)** Região da adeno-hipófise “*pars intermedia*”: apresentando as células produtoras de somatotropina (cabeça de seta) e as células produtoras de melanotropina (seta). **A,B:** Tricrômio de Mallory. **C,D:** Ácido Periódico de Schiff (PAS). **A,B,C,D:** Barra = 20µm.

Figura 18: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A,C,F)** Regiões da adeno-hipófise: “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A)** Resultado da reação com o anti-prolactina de salmão (sPRL). Notar a forte marcação de anti sPRL apenas na região da RPD. **B)** Detalhe da reação com o anti sPRL na RPD. **C)** Resultado da reação com o anti-somatolactina de salmão (sSL). Notar a forte marcação de anti sSL na PI. **D)** Detalhe da reação com o anti sSL na PI. Observar a presença de aglomerados de células imunorreativas e a forte marcação de anti sSL. **E)** Resultado da reação com o anti sSL na PI, notar a reação cruzada com as células gonadotrópicas na PPD (cabeça de seta). **F)** Resultado da reação com o anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH). Notar a forte marcação de anti sGH apenas na região da PPD. **A,C,F:** Barra = 300µm. **B,D:** Barra = 20µm. **E:** Barra = 50µm.

Figura 19

Figura 19: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-B)** “*Proximal pars distalis*”. **A)** Detalhe da reação com anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH). Notar a presença de aglomerados de células imunorreativas (cabeça de seta). **B)** Resultado da reação de imuno-histoquímica com anti sGH, evidenciando as células imunorreativas isoladas (cabeça de seta). **C,D,E,F)** Dualidade das células gonadotrópicas. Anticorpos utilizados: anti- β -hormônio folículo estimulante de salmão (β -FSH) e anti- β -hormônio luteinizante de salmão (β -LH). Anticorpo doado pelo prof. Kawauchi. **C,D)** Regiões da adeno-hipófise: “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). Notar que, com o anticorpo anti β -FSH, as secções histológicas seriadas apresentam mais marcação de fundo (background) do que com anti β -LH. **C)** Resultado da reação com anti β FSH. Notar a fraca reação da imuno-histoquímica na região PPD. **D)** Resultado da reação com anti β LH. Notar a fraca reação da imuno-histoquímica na região PPD. **E)** Detalhe da reação com anti β FSH (cabeça de seta). Notar a fraca reação das células produtoras de hormônio folículo estimulante da tabarana com este anticorpo de salmão. **F)** Detalhe da reação com anti β LH (cabeça de seta). Notar a fraca reação das células produtoras de hormônio luteinizante da tabarana com este anticorpo de salmão. **A,B:** Barra = 20 μ m. **C,D:** Barra = 300 μ m. **E,F:** Barra = 50 μ m.

Figura 20

Figura 20: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-H)** Dualidade das células gonadotrópicas. **A,B,E,F)** Regiões da adeno-hipófise: “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A-D)** Anticorpos utilizados: anti- β -hormônio folículo estimulante de salmão (β -FSH) e anti- β -hormônio luteinizante de salmão (β -LH). Anticorpo doado pelo prof. Dr. Shimizu. **A)** Resultado da reação com anti β FSH. Notar a pequena reação na região PPD. **B)** Resultado da reação com anti β LH. Notar a pequena reação na região PPD, além de se observar que, com o anticorpo anti β LH de salmão, as secções histológicas apresentam mais marcação de fundo (background) do que com anti β FSH de salmão. **C)** Detalhe da reação com anti β FSH (cabeça de seta), evidenciando a fraca reação das células produtoras de FSH da tabarana. **D)** Detalhe da reação com anti β LH (cabeça de seta), evidenciando a fraca reação das células produtoras de LH da tabarana. **E-F)** Anticorpos utilizados: anti- β -hormônio folículo estimulante de *mummichog* (β -FSH) e anti- β -hormônio luteinizante de *mummichog* (β -LH). **E)** Resultado da reação com anti β FSH. Notar a falta de reação na região PPD. **F)** Resultado da reação com anti β LH. Notar a falta de reação na região PPD, além de se observar que, com o anticorpo anti β FSH e anti β LH ambos de *mummichog*, as secções histológicas seriadas não apresentam diferença na marcação de fundo (background). **G)** Detalhe da reação com anti β FSH (cabeça de seta), evidenciando a falta de reação das células produtoras de hormônio folículo estimulante da tabarana. **H)** Detalhe da reação com anti β LH (cabeça de seta), evidenciando a falta de reação das células produtoras de hormônio folículo estimulante da tabarana. **A,B,E,F:** Barra = 300 μ m. **C,D:** Barra = 50 μ m. **G,H:** Barra = 20 μ m.

Figura 21

Figura 21: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-F)** Dualidade das células gonadotrópicas. **A,C,D)** Regiões da adeno-hipófise: “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A-B)** Anticorpo utilizado: anti- α -gonadotropina de *mummichog* (α GtH). **A)** Resultado da reação com anti α GtH, notar a pequena reação da imuno-histoquímica na região PPD. **B)** Detalhe da reação imuno-histoquímica com anti α GtH, evidenciando a pequena reação da imuno-histoquímica na região PPD. **C-F)** Anticorpo utilizado: anti- α - β -gonadotropina de carpa (α - β GtH) e anti- β -gonadotropina (β GtH). Anticorpo doado pelo prof. Dr. Mancera. **C)** Resultado da reação com anti α - β GtH. **D)** Resultado da reação com anti β GtH. Notar a reação da imuno-histoquímica na região PPD. **E)** Detalhe da reação com anti α - β GtH (cabeça de seta), evidenciando a fraca reação. **F)** Detalhe da reação com anti β GtH (cabeça de seta), evidenciando a fraca reação. **A,C,D:** Barra = 300 μ m. **B:** Barra = 20 μ m. **E,F:** Barra = 50 μ m.

Figura 22: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-D)** Dualidade das células gonadotrópicas. Anticorpo utilizado: anti- α - β -gonadotropina de carpa (α - β GtH) e anti- β -gonadotropina (β GtH). **A-B)** Resultado das reações imuno-histoquímicas em secções histológicas adjacentes. **A)** com anti α - β GtH (cabeça de seta). **B)** com anti β GtH (cabeça de seta). Notar que existe um padrão de imunorreatividade diferente entre a duas secções histológicas (imagens A e B). **C-D)** Detalhes dos resultados das reações imuno-histoquímicas em um menor aumento. **C)** com anti α - β GtH (cabeça de seta). **D)** com anti β GtH (cabeça de seta). Notar que existe um padrão de imunorreatividade diferente entre a duas secções histológicas (imagens C e D). **A,B:** Barra = 100 μ m. **C-D:** Barra = 50 μ m.

Mallory

A

PAS

B

α - β GtH

C

β GtH

D

sGH

E

sSL

F

sPRL

G

Figura 23: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações histoquímicas e imuno-histoquímicas. **A-G)** “*pars intermedia*” (PI), “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A)** Tricrômio de Mallory. **B)** Ácido Periódico de Schiff (PAS), os asteriscos indicam as reações PAS positivas nas células produtoras de gonadotropinas e somatolactina, respectivamente ns regiões PPD e PI; neuro-hipófise (NH). **C)** Resultado da reação imuno-histoquímica com α - β GtH de carpa. Anticorpo que mais reagiu com as células produtoras de gonadotropinas de tabarana. **D)** Resultado da reação imuno-histoquímica com β GtH de carpa. **E)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-salmon hormônio de crescimento (sGH). Observar a forte marcação do anticorpo de salmão nas células produtoras de hormônio de crescimento da tabarana na região PPD. **F)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-salmon somatolactina (sSL). Notar a forte marcação do anticorpo de salmão nas células produtoras de somatolactina da tabarana na região PI. **G)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-salmon prolactina (sPRL). Observar a forte marcação do anticorpo de salmão nas células produtoras de prolactina da tabarana apenas na região da RPD. **A-G:** Barra = 300 μ m.

Figura 24

Figura 24: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-H)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no cativeiro. Notar a variação da intensidade da imuno-reação e do número de células produtoras de GH marcadas ao longo do ciclo reprodutivo. **A,C,E,G)** “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas durante o estágio repouso. **B)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio repouso. **C)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de maturação inicial. **D)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maturação inicial. **E)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio maturação avançada. **F)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maturação avançada. **G)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de regressão/esgotado. **H)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio regressão/esgotado. **A,C,E,G:** Barra = 300µm. **B,D,F,H:** Barra = 20µm.

Figura 25: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-F)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no ambiente natural. Notar a variação da intensidade da imuno-reação e do número de células produtoras de GH marcadas ao longo do ciclo reprodutivo. **A,C,E)** “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas durante o estágio repouso. **B)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio repouso. **C)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio maduro. **D)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maduro. **E)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de regressão/esgotado. **F)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio regressão/esgotado. **A,C,E:** Barra = 300µm. **B,D,F:** Barra = 20µm.

Figura 26: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-D)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-hormônio de crescimento de salmão (sGH) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no ambiente impactado por barragem. Notar a variação da intensidade da imuno-reação e do número de células produtoras de GH marcadas ao longo do ciclo reprodutivo. **A,C)** “pars intermedia” (PI); “rostral pars distalis” (RPD) e “proximal pars distalis” (PPD). **A)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio repouso. **B)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio repouso. **C)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio maduro. **D)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maduro. **A,C:** Barra = 300µm. **B,D:** Barra = 20µm.

Figura 27

Figura 27: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-H)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-somatolactina de salmão (sSL) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no cativeiro. Notar a variação da intensidade da imuno-reação e do número de células produtoras de SL marcadas ao longo do ciclo reprodutivo. **A,C,E,G)** “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas durante o estágio repouso. **B)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio repouso. **C)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de maturação inicial. **D)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maturação inicial. **E)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio maturação avançada. **F)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maturação avançada. **G)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de regressão/esgotado. **H)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio regressão/esgotado. **A,C,E,G:** Barra = 300µm. **B,D,F,H:** Barra = 20µm.

Figura 28: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-F)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-somatolactina de salmão (sGH) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no ambiente natural. Notar a variação da intensidade da imuno-reação e do número de células produtoras de SL marcadas ao longo do ciclo reprodutivo. **A,C,E)** “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas durante o estágio repouso. **B)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio repouso. **C)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio maduro. **D)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maduro. **E)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de regressão/esgotado. **F)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio regressão/esgotado. **A,C,E:** Barra = 300µm. **B,D,F:** Barra = 20µm.

Figura 29: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-D)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-somatolactina de salmão (sSL) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no ambiente impactado por barragem. Notar a variação da intensidade da imuno-reação e do número de células produtoras de SL marcadas ao longo do ciclo reprodutivo. **A,C)** “pars intermedia” (PI); “rostral pars distalis” (RPD) e “proximal pars distalis” (PPD). **A)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio repouso. **B)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio repouso. **C)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio maduro. **D)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maduro. **A,C:** Barra = 300µm. **B,D:** Barra = 20µm.

Figura 30

Figura 30: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-H)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-prolactina de salmão (sPRL) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no cativeiro. Notar a variação da intensidade da imuno-reação e do número de células produtoras de PRL marcadas ao longo do ciclo reprodutivo. **A,C,E,G)** “*pars intermedia*” (PI); “*rostral pars distalis*” (RPD) e “*proximal pars distalis*” (PPD). **A)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas durante o estágio repouso. **B)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio repouso. **C)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de maturação inicial. **D)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maturação inicial. **E)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio maturação avançada. **F)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio maturação avançada. **G)** Aspecto geral da imunorreatividade dessas células durante o estágio de regressão/esgotado. **H)** Detalhe das células imuno-reativas durante o estágio regressão/esgotado. **A,C,E,G:** Barra = 300µm. **B,D,F,H:** Barra = 20µm.

Figura 31: *Salminus hilarii* – A hipófise e as células adeno-hipofisárias de tabarana. Reações imuno-histoquímicas. **A-D)** Resultado da reação imuno-histoquímica com anti-hormônio de salmão (sGH) durante o ciclo reprodutivo em animais capturados no cativeiro (grupo experimental 03). Região da “proximal pars distalis”. **A)** Imagem sem tratamento pelo programa *MATLAB*. Notar as reações imuno-histoquímica selecionadas para ser analisada (cabeça de seta). **B)** Resultado da análise realizada pelo programa *MATLAB*. Observar que este programa fornece uma imagem sem a coloração selecionada (marrom). As cabeças de seta ilustram as regiões, nas quais a coloração marrom foi contabilizada pelo programa. **C)** Aspecto geral da mesma imagem, indicando as campos que foram selecionados para analisar os núcleos das células não marcadas com o anticorpo anti-GH (cabeça de seta) para a análise relativa. **D)** Resultado da análise realizada pelo programa *MATLAB*. Observar que este programa contabiliza regiões que não foram selecionadas (cabeça de seta). **A-D:** Barra = 20µm.

Figura 32: *Salminus hilarii* – Concentração plasmática de estradiol em fêmeas, por estágio de maturação gonadal e por grupo experimental. ^{a,b} Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo estágio e ambientes diferentes; * Símbolos diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo ambiente e estádios diferentes.

Figura 33: *Salminus hilarii* – Concentração plasmática de testosterona em fêmeas, por estágio de maturação gonadal e por grupo experimental. ^{a,b} Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo estágio e ambientes diferentes; * Símbolos diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo ambiente e estádios diferentes.

Figura 34: *Salminus hilarii* – Concentração plasmática de 17α-hidroxiprogesterona em fêmeas, por estágio de maturação gonadal e por grupo experimental. ^{a,b} Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo estágio e ambientes diferentes; * Símbolos diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro de um mesmo ambiente e estágios diferentes.

10 – Anexos

ANEXO 01

1 – Protocolo de análises de histoquímica de gônadas (ovários e testículos) e hipófise.

1.1 – Inclusão do material biológico.

Para a inclusão do material biológico, os tecidos fixados passaram por imersão em uma bateria de álcool e xilol (P.A.) para a desidratação desse material e em seguida, todos os tecidos foram infiltrados e incluídos em *paraplast* (*Erv-Plast* – Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda), para posterior secção no micrótomo, a desidratação consta dos seguintes passos:

- ⇒ Álcool a 95%;
- ⇒ Álcool absoluto (2 vezes);
- ⇒ Xilol (2 vezes);
- ⇒ *Paraplast* (3 vezes).

Para cada passo descrito acima, a duração de cada imersão foi de 1 hora.

É importante salientar que, para os ovários no estágio maduro ou maturação avançada o tempo de infiltração no *paraplast* foi superior a 3 horas como descrito acima. Este procedimento foi necessário, pois devido ao maior tamanho do material, a infiltração de *paraplast* no tecido ocorre de forma mais lenta. Neste caso, para os ovários no estágio maduro ou maturação avançada, o tempo de infiltração foi de 12 horas.

Este procedimento foi realizado para a hipófise, ovários e testículos.

1.2 – Secção do material biológico.

A secção do material biológico foi realizada em micrótomo (Leica – RM/2155), equipado com lâminas descartáveis. As secções foram obtidas com 5µm de espessura (para todos os materiais processados neste estudo).

Os cortes obtidos foram montados em lâminas com poli-lisina (*Poly-Lysine Solution Sigma Diagnostics INS, St. Louis M.O. USA*) diluída em 1:5 (em água destilada), esta solução auxilia a fixação dos cortes nas lâminas. Em seguida, inicia-se o procedimento de coloração do tecido.

É importante salientar que para as secções da hipófise foram realizadas secções seriadas deste material biológico.

1.3 – Técnicas rotineiras de colorações segundo Behmer *et al.*, (1976).

1.3.1 – Hematoxilina e Eosina.

As lâminas montadas com os tecidos passam por imersão nas seguintes soluções e corantes, nos respectivos tempos:

– Hidratação do material:

- ⇒ Xilol (2 vezes) – 3 minutos cada;
- ⇒ Álcool absoluto – 3 minutos;
- ⇒ Álcool a 96% – 3 minutos;
- ⇒ Álcool a 70% – 3 minutos;
- ⇒ Lavar em água corrente – 3 minutos;

– Coloração do material:

- ⇒ Hematoxilina – 5 minutos;
- ⇒ Lavar em água corrente – 3 minutos;
- ⇒ Diferenciar em Álcool–Ácido clorídrico (1ml de ácido clorídrico para 99 ml de álcool a 70%), até que os núcleos fiquem bem diferenciados;
- ⇒ Lavar em água corrente – 3 minutos;
- ⇒ Eosina – 2 minutos;

– Desidratação e montagem:

- ⇒ Álcool a 96% – 3 minutos;
- ⇒ Álcool absoluto – 3 minutos;

- ⇒ Álcool absoluto + Xilol (proporção de 1:1) – 3 minutos;
- ⇒ Xilol (2 vezes) – 3 minutos cada;
- ⇒ Montagem com goma Damar.

Este tipo de coloração foi realizado para os ovários e testículos.

1.3.2 – Tricrômio de Mallory.

As lâminas montadas com os tecidos passam, por imersão pelas seguintes soluções e corantes, nos respectivos tempos:

– Hidratação do material:

Mesmo procedimento descrito no item 1.3.1 (Hematoxilina e Eosina);

– Coloração do material:

⇒ Solução A (Fuccina ácida) – 5 minutos;

⇒ Solução B (Mallory) – 7 minutos;

⇒ Diferenciar em Álcool absoluto, até sair o excesso de corante;

– Desidratação e montagem:

Mesmo procedimento descrito no item 1.3.1 (Hematoxilina e Eosina);

Este tipo de coloração foi realizado apenas para a hipófise.

1.3.3 – Ácido Periódico de Schiff (PAS).

As lâminas montadas com os tecidos passam, por imersão pelas seguintes soluções e corantes, nos respectivos tempos:

– Hidratação do material:

Mesmo procedimento descrito no item 1.3.1 (Hematoxilina e Eosina);

– Coloração do material:

- ⇒ Ácido Periódico – 10 minutos;
- ⇒ Lavar em água corrente – 3 minutos;
- ⇒ Reativo de Schiff – 30 minutos;
- ⇒ Lavar em água corrente – 3 minutos;
- ⇒ Hematoxilina – 2 minutos;
- ⇒ Lavar em água corrente – 3 minutos;

– Desidratação e montagem:

Mesmo procedimento descrito no item 1.3.1 (Hematoxilina e Eosina);

Este tipo de coloração foi realizado apenas para a hipófise.

ANEXO 02

1 – Protocolo de análises de imuno-histoquímica de hipófise.

1.1 – Inclusão do material biológico.

Este procedimento foi o mesmo utilizado para a inclusão do material, descrito no Anexo 01, item 1.1 (Inclusão do Material Biológico).

1.2 – Secção do material biológico.

Este procedimento foi o mesmo utilizado para a inclusão do material, descrito no Anexo 01, item 1.2 (Secção do Material Biológico).

1.3 – Técnicas de Imuno-histoquímica.

Para as reações de imuno-histoquímicas, as secções histológicas seriadas obtidas da hipófise foram processadas de acordo com o método SABC (*Streptavidin-Biotin-peroxidase Complex – Dako Cytomation LSAB₂[®] System HRP Liquid DAB – Ref. 0673*), seguindo este protocolo:

- ⇒ Xilol (3 vezes) – 10 minutos cada;
- ⇒ Álcool absoluto – 10 minutos;
- ⇒ Álcool a 96% – 10 minutos;
- ⇒ Álcool a 70% – 10 minutos;
- ⇒ PBS (*fosfate buffer saline*), com pH 7,6 – 5 minutos;
- ⇒ Bloqueio da peroxidase endógena, 3% H₂O₂ diluído em PBS – 20 minutos (no escuro);
- ⇒ PBS – 5 minutos;
- ⇒ Bloqueios dos sítios inespecíficos, leite mólico 5% (leite em pó diluído em PBS) – 20 minutos;
- ⇒ Incubar com os anticorpos primários (tabela 01) a 4°C – 24 horas;
- ⇒ PBS – 5 minutos;

- ⇒ Anticorpo secundário Biotinilado (*Dako Cytomation LSAB₂[®] System HRP*) – 30 minutos;
- ⇒ PBS (2 vezes) – 5 minutos cada;
- ⇒ Complexo Streptavidina + biotina + Peroxidase (SABC) (*Dako Cytomation LSAB₂[®] System HRP*) – 30 minutos;
- ⇒ PBS (2 vezes) – 5 minutos cada;
- ⇒ Revelar ao microscópio com DAB (3,3 – diaminobenzidina) (*Dako Cytomation LSAB₂[®] System HRP*);
- ⇒ Passar pela hematoxilina – 2 a 3 minutos;

- Desidratar e montar as lâminas:
 - ⇒ Álcool a 70% – 3 minutos;
 - ⇒ Álcool a 96% – 3 minutos;
 - ⇒ Álcool absoluto (2 vezes) – 3 minutos cada;
 - ⇒ Álcool absoluto + xilol (proporção de 1:1) – 3 minutos;
 - ⇒ Xilol (2 vezes) – 3 minutos cada;
 - ⇒ Montagem com goma Damar.

ANEXO 03

1 – Protocolo de análises dos esteróides gonadais (17 α -hidroxiprogesterona, estradiol e testosterona).

1.1 – Protocolo de análise para 17 α -hidroxiprogesterona.

Para a análise do hormônio 17 α -hidroxiprogesterona, utilizou-se o “kit” comercial de Elisamunoensaio (DSL10/6800 – *Diagnostic System Laboratories, INC*). Este “kit” contém:

- ⇒ 6 padrões para 17 α -hidroxiprogesterona;
- ⇒ 2 controles para 17 α -hidroxiprogesterona;
- ⇒ Antisoro para 17 α -hidroxiprogesterona;
- ⇒ Conjugado de Biotina Concentrado 17 α -hidroxiprogesterona;
- ⇒ Diluente de Conjugado Biotina 17 α -hidroxiprogesterona;
- ⇒ Concentrado Conjugado Enzimático Estreptavidina 17 α -hidroxiprogesterona;
- ⇒ Diluente de Conjugado Enzimático de Estreptavidina 17 α -hidroxiprogesterona;
- ⇒ Solução de lavagem;
- ⇒ Solução Cromógena de Tetrametilbenzidina (TMB);
- ⇒ Solução de interrupção (STOP);
- ⇒ Placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, nas quais são colocadas as amostras, totalizando 96 poços.

As amostras foram descongeladas até atingir temperatura ambiente e homogeneizadas para o início da análise.

O suporte com as tiras foi marcado para posterior identificação das amostras, colocando nas primeiras cavidades, 50 μ l dos 6 padrões fornecidos pelo kit (0; 0.1; 0.5; 1.5; 7.5 e 20 ng/ml). Em seguida, 50 μ l do controle 1 e 2 e das amostras foram colocados nos poços seguintes. Essa análise foi feita em

duplicata para os padrões, controles e amostras. Foi separado também um poço para o branco.

A solução de Conjugado de Biotina foi preparada no momento do uso do ensaio, utilizando-se 3,75ml de Diluente e 75µl de Concentrado de Biotina, e adicionado 50µl em cada poço das amostras e reagentes, exceto no branco.

Foi adicionado 100µl de antisoro em cada poço, agitando a placa levemente por 5 segundos. Posteriormente, a placa foi colocada no agitador, onde ficou por 1 hora na velocidade de 170rpm. Depois de agitado, desprezou-se o conteúdo da placa, lavando cada poço com 300µl de solução de lavagem previamente preparada. A lavagem foi realizada 5 vezes em cada poço.

Adicionou-se 200µl de Solução de Conjugado Enzimático Estreptavidina em cada poço, exceto no branco, e colocada no agitador por mais 30 minutos na velocidade de 170rpm. A solução de Conjugado Enzimático Estreptavidina foi preparada no momento do uso do ensaio, utilizando-se 300µl de Concentrado e 15ml de Diluente de Estreptavidina.

Após 30 minutos, desprezou-se o conteúdo da placa e, novamente a mesma foi lavada com 300µl de solução de lavagem por 5 vezes.

Foi adicionado 100µl de Solução Cromógena TMB (solução de coloração da reação) em todos os poços e colocada no agitador novamente por 30 minutos. A placa foi coberta com papel alumínio antes de ser colocada no agitador, para que a luz e o oxigênio não interferissem na reação.

Após todo esse procedimento, foi adicionado 100µl de solução STOP (solução de interrupção da reação, de composição ácida) em cada poço, esperando-se por aproximadamente 15 segundos para a leitura final e conseqüentemente, para obtenção dos resultados.

As amostras, os controles e os padrões foram lidos em uma leitora de microplaca de Elisa (Tecan – *Sunrise*) a um comprimento de onda de 450nm.

1.2 – Protocolo de análise para estradiol.

Para a análise do hormônio estradiol, também foi utilizado o “kit” comercial de Elisamunoensaio (DSL10/4300 – *Diagnostic System Laboratories, INC*). Este “kit” contém:

- ⇒ 7 padrões para Estradiol;
- ⇒ 2 controles para Estradiol;
- ⇒ Conjugado de Biotina Concentrado Estradiol;
- ⇒ Diluente de Conjugado Biotina Estradiol;
- ⇒ Concentrado Conjugado Enzimático Estreptavidina Estradiol;
- ⇒ Diluente de Conjugado Enzimático de Estreptavidina Estradiol;
- ⇒ Solução Cromógena de Tetrametilbenzidina (TMB);
- ⇒ Solução de interrupção (STOP);
- ⇒ Placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, totalizando 96 poços.

O procedimento do ensaio foi o mesmo realizado no item 1.1 (Protocolo de análise de 17α -hidroxiprogesterona), com a diferença de que o kit para o estradiol não possui o antisoro e, conseqüentemente, pula-se esta etapa.

Os valores dos padrões do kit para Estradiol são de 0; 20; 50; 250; 750; 2000 e 6000 pg/ml. As amostras, os controles e os padrões foram lidos também em uma leitora de microplaca de Elisa (Tecan – *Sunrise*) a um comprimento de onda de 450nm.

1.3 – Protocolo de análise para testosterona.

Para a análise do hormônio testosterona, também por Elisaimunoensaio, utilizou-se o “kit” comercial para testosterona Ultra-Sensível EIA (DSL10/49200 – *Diagnostic System Laboratories*, INC). Este “kit” contém:

- ⇒ 6 padrões para Testosterona ultra-sensível;
- ⇒ 2 controles para Testosterona ultra- sensível;
- ⇒ Conjugado de Biotina Concentrado Testosterona ultra-sensível;
- ⇒ Diluente de Conjugado Biotina Testosterona ultra-sensível;
- ⇒ Concentrado Conjugado Enzimático Estreptavidina Testosterona ultra-sensível;
- ⇒ Diluente de Conjugado Enzimático de Estreptavidina Testosterona ultra-sensível;
- ⇒ Solução de lavagem;
- ⇒ Solução Cromógena de Tetrametilbenzidina (TMB);
- ⇒ Solução de interrupção (STOP);
- ⇒ Placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, totalizando 96 poços.

O procedimento do ensaio foi o mesmo realizado no item 1.1 (Protocolo de análise de 17α -hidroxiprogesterona), com a diferença de que o kit para a testosterona não possui o antisoro e, conseqüentemente, pula-se esta etapa.

Os valores dos padrões do kit para testosterona ultra-sensível são de 0; 5.0; 25.0; 100.0; 300.0; 1000 e 3000 ng/ml. As amostras, os controles e os padrões foram lidos também em uma leitora de microplaca de Elisa (Tecan – *Sunrise*) a um comprimento de onda de 450nm.