



Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa  
Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável

**ASPECTOS HISTOLOGICOS DE TESTÍCULOS DA TUVIRA  
(*Gymnotus spp.*) SUBMETIDA À REPRODUÇÃO POR DIFERENTES  
INDUTORES HORMONAIIS**

Goiânia  
2015

Roberta Martins Rosa

**ASPECTOS HISTOLOGICOS DE TESTÍCULOS DA TUVIRA  
(*Gymnotus spp.*) SUBMETIDA À REPRODUÇÃO POR DIFERENTES  
INDUTORES HORMONAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Delma Machado Cantisani Pádua

Goiânia

205

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)  
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

Rosa, Roberta Martins.

R788a Aspectos histológicos de testículos da tuvira (*Gymnotus* spp.)  
submetida à reprodução por diferentes indutores hormonais  
[manuscrito] / Roberta Martins Rosa – Goiânia, 2015.  
57 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de  
Goiás, Programa de Pós-Graduação *Strito Senso* em Ecologia e  
Produção Sustentável, 2015.

“Orientadora: Profa. Dra. Delma Machado Cantisani Pádua”.  
Bibliografia.

1. Peixes - Histologia. I. Título.

CDU 636.082(043)

**ROBERTA MARTINS ROSA**

**ASPECTOS HISTOLÓGICOS DE TESTÍCULOS DA TUVIRA (*Gymnotus spp*) SUBMETIDA À REPRODUÇÃO POR DIFERENTES INDUTORES HORMONAIS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DEFENDIDA E APROVADA EM 27 DE FEVEREIRO DE 2015**

**BANCA EXAMINADORA**



.....  
Prof. Dra. Delma Machado Cantisani Pádua / PUC Goiás  
(presidente-orientador)



.....  
Prof. Dra. Fernanda Gomes de Paula / UFG  
(avaliador externo)



.....  
Prof. Dr. Marcos Antonio da Silva / PUC Goiás  
(avaliador interno)

## DEDICATÓRIA

Minha filha Isadora Martins Golynski,  
minha mãe Odete Martins Neto, meu  
pai Bernardino Rosa Júnior e meu  
marido Adelmo Golynski, dedico com  
amor.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelo programa de mestrado.

A minha orientadora, professora Delma M. C. Pádua, pela orientação fornecida.

A todos os professores do programa de mestrado pelos ensinamentos que me enriqueceram muito como ser humano, especialmente aos professores Roberto Toledo, Leonardo Tegerina e Marcos Antônio.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos pela licença e auxílio capacitação.

A minha filha Isadora que inevitavelmente abdicou da minha presença por vários momentos.

Ao meu marido Adelmo Golynski e minha mãe Odete Martins pelo amor ofertado.

Aos meus familiares Adalberto Ribeiro, Janete Golynski, Anselmo Golynski, Kátia Fernandes e Amanda Golynski pelo apoio no decorrer do curso.

As minhas amigas de experimento Jéssica Meireles, Amanda Alvarenga, Crislielle Nunes e Marta Moi pela amizade, generosidade, carinho, ajuda e apoio.

Novamente a professora Dra. Delma M. C. Pádua por permitir que trabalhasse com estas alunas, que foram um presente Divino.

Aos professores Dr. Bruno Mariano e Dr. Verner Eichler pelo concedimento ao uso dos laboratórios da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, nos finais semana.

Sr. José Neves Coelho, Sr. Hamilton Sousa Bastos e Rafael Freitas, pela ajuda fornecida nos laboratórios.

Ao Hugo Militão, Cíntia Leão, Graciela Pessoa, Paula Medeiros, Nadson Pontes, Emerson Trogello, Marcelo Martins e Professora Mônica pela ajuda e companherismo.

A Deus por manifestar o amor em mim.

A todos mencionados acima, minha eterna gratidão.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar os aspectos histológicos de testículos de tuiuba (*Gymnotus spp.*) submetida a reprodução por diferentes indutores hormonais. Foram capturadas sessenta tuiubas, de aproximadamente 40g±10g e transportadas para o setor de piscicultura da PUC - Goiás. Os peixes foram acondicionados durante o período de dezembro de 2013 a fevereiro de 2014, passando por um período de adaptação ao cativeiro de 90 dias. Utilizando delineamento inteiramente casualizado, foram definidos quatro tratamentos com dez repetições ou seja, dez animais por caixa, sendo cada animal uma repetição. Para indução a reprodução da tuiuba, foram testados três hormônios e para o grupo controle, solução salina a 2%. Os utilizados foram: o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), a gonadotropina coriônica equina (eCG) e análogo sintético do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH-a). Os três hormônios foram aplicados em duas dosagens, sendo a primeira (preparatória) com a finalidade de promover a maturação total dos gametas e a segunda com a finalidade de liberação dos gametas. Para as análises histológicas, foram eutanasiados cinco machos de cada tratamento, os testículos foram avaliados e retirados através de secção ventral da cavidade celomática e armazenados rapidamente em solução fixadora de Bouin por vinte e quatro horas. Após a fixação dos testículos, lâminas foram confeccionadas e fotografadas no Laboratório de Sistemática Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Foram fotografadas 15 imagens por peixe em fotomicroscópio, onde destas, dez imagens foram analisadas utilizando o software Image-Pro Plus ®. A proporção volumétrica ocupada pelos componentes do parênquima testicular (túbulos seminíferos e tecido intertubular) foi determinada a partir da contagem de 2660 pontos projetados sobre dez imagens obtidas ao acaso, sendo 266 pontos em cada imagem. Foram quantificadas as populações de espermatogônias do tipo A, do tipo B, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermatídes e células de Sertoli (S) e proporção de Lúmen. Os dados obtidos foram analisados pela comparação de médias através do teste de TUKEY, executado pelo software Statistical Analysis System - SAS. Os resultados indicaram que o hormônio GnRH-a apresentou uma maior capacidade para promover a maturação final nos testículos, seguido pelo hormônio eCG. O hormônio EBHC não conseguiu promover a maturação final nas tuiubas induzidas, sugerindo um maior tempo de ação que os demais hormônios utilizados. Uma possível explicação para a maior indução do hormônio GnRH-a seria na capacidade de produzir gonadotrofinas endógenas. Os demais hormônios teriam suas respostas justificadas na especificidade dos receptores de membrana das células de Sertoli e Leydig. Maiores estudos sobre a resposta de tuiubas a indutores hormonais, se fazem necessárias.

Palavras-chave: Tuiubas, GnRH-a, eCG, EBHC, Histologia.

## ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the histological aspects of tuvira testes (*Gymnotus* spp.) subjected to reproduction by different hormonal inducers. Sixty tuviras were captured, approximately  $40g \pm 10g$  and transported to fish sector of PUC -Goiás. The fish were placed during the period from December 2013 to February 2014, in a period of adaptation to 90 days. Using a randomized design, has defined four treatments with ten repetitions or ten animals per box, each animal being a repeat. For induction of tuvira, three hormones were tested. The control group, used saline at 2%, the others group used: the extract of carp pituitary (EBHC), equine chorionic gonadotropin (ECG) and synthetic analogue of gonadotropin-releasing hormone (GnRH-a). The three hormones were applied in two doses, the first one (preparatory) in order to promote full maturation of gametes and the second for the purpose of releasing the gametes. For histological analysis, were killed five males per treatment, the testicles were removed and evaluated by the ventral section of the coelomic cavity and quickly stored in Bouin's fixative solution for twenty-four hours. After fixation of the testicles, slides were prepared and photographed at the Molecular Systematics Laboratory of the Federal University of Viçosa. Were photographed 15 frames per fish in light microscope, where these ten images were analyzed using the software Image-Pro Plus ®. The volume ratio occupied by the components of testicular parenchyma (seminiferous tubules and intertubular tissue) was determined by counting 2660 points projected on ten images obtained at random, with 266 points in each image. Populations were quantified spermatogonia type A, type B, primary spermatocytes, secondary spermatocytes, spermatids and Sertoli cells (S) and the proportion of the lumen. Data were analyzed by comparison of means by Tukey test, performed by the Statistical Analysis System software - SAS. The results indicate that the GnRH-hormone showed a greater ability to promote final maturation in the testes, followed by ECG hormone. The EBHC hormone failed to promote the final maturation induced tuviras, suggesting a longer duration than other hormones used. One possible explanation for the greater induction of the GnRH-hormone would be the ability to produce endogenous gonadotropins. Other hormones have justified their answers in the specificity of membrane receptors on Sertoli cells and Leydig. Researching the tuviras response to hormonal inducers, are required.

.  
Keywords: Tuviras, GnRH-a, eCG, EBHC, Histology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Características externas da tuvira, <i>Gynmotus</i> spp. Na cabeça é possível visualizar os pequenos olhos e a prognatismo da espécie (detalhe no canto direito superior). .....	16
Figura 2: Esquematização dos mecanismos neuroendócrinos no cérebro da tuvira. ....	20
Figura 3: Esquematização dos mecanismos neuroendócrinos da espermatogênese. Representação das Células de Leydig e Sertoli dos testículos de tuviras.....	25
Figura 4: Vista aérea do Instituto Federal Goiano- Campus Morrinhos e do lago Paranoá (indicado pela seta). .....	30
Figura 5: Caixa d'água dotada de sistema air lifting. ....	32
Figura 6: Software Image-Pro Plus ® aplicando uma gradícula de 266 pontos sobre a imagem de uma lâmina. O ponto é determinado pela intersecção de uma linha vertical com uma linha horizontal (círculo negro evidenciado na imagem indicando um ponto). ....	35
Figura 7: Interior da cavidade celomática de uma tuvira evidenciando os testículos (T) ovais de coloração amarelo esbranquiçadas, localizados ventralmente. Os dutos espermáticos (DE), estão localizados cranialmente aos testículos. ....	36
Figura 8: Papila urogenital (PU), próxima a base do opérculo (O) ao lado do ânus (A). ....	37
Figura 9: Corte histológico do testículo de tuvira induzida por GnRH indicando a presença de túbulos anastomosados (II) e um túbulo íntegro (I) iniciando processo de anastomose (região evidencia). ....	39
Tabela 1: Médias por tratamento encontrados para as proporções das células da linhagem espermatogênica, Sertoli e Lúmen. ....	40
Figura 10: Corte histológico do testículo de tuvira do grupo controle indicando espermatogônia primária isolada (I) e par de espermatogônias primárias (II). ....	41
Figura 11: Corte histológico do testículo de tuvira do grupo controle indicando cistos de quatro gerações de espermatogônias secundárias em ordem crescente de divisão (I, II, III e IV). ....	42
Figura 12: Corte histológico do testículo de tuvira induzida com o hormônio GnRH indicando dois cistos de espermatócitos primários (I). ....	44
Figura 13: Corte histológico do testículo de tuvira induzida com o hormônio EBHC indicando um cisto de espermatócito primário (I), dois cistos de espermatócitos secundários (II) e um cisto de espermátide (III). ....	46
Figura 14: Corte histológico do testículo de tuvira induzida com os hormônios eCG (A) e EBHC (B) indicando um cisto de espermátides rompido (I), um cisto de espermátide íntegro (II) e um cisto de espermatócitos secundários. ....	48

Figura 15: Corte histológico do testículo de tuvíra induzida com os hormônios GnRH indicando células de Sertoli (I) e cistos de espermatogônias B (II).....49

Figura 16: Corte histológico do testículo de tuvíras mostrando o lúmen tubular com espermatozoides (setas). A figura A representa o grupo controle, a figura B representa o grupo induzido com o hormônio GnRH, a figura C representa os animais induzidos com o hormônio. ....50

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
3.1 Caracterização da espécie estudada ( <i>Gymnotus ssp</i> ) .....	16
3.2 Importância da reprodução artificial .....	18
3.3 Mecanismos neuroendócrinos na reprodução de peixes .....	19
3.4 Espermatogênese .....	21
3.4.1 Proliferação mitótica das espermatogônias.....	22
3.4.2 Proliferação meiótica dos espermatócitos .....	23
3.4.3 Espermiogênese .....	23
3.4.4 Mecanismos neuroendócrinos da espermatogênese .....	24
<b>3.5 Estrutura dos Testículos</b> .....	<b>25</b>
<b>3.6 Indutores Hormonais</b> .....	<b>27</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 Captura.....	30
4.2 Delineamento e condições experimentais .....	31
4.3 Tratamentos experimentais.....	32
4.4 Análises Histológicas .....	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>5.1 Características anatômicas</b> .....	<b>36</b>
<b>5.2 Características histológicas</b> .....	<b>37</b>
5.2.1 Espermatogônias A .....	39
5.2.2 Espermatogônias B .....	41
5.2.3 Espermatócitos primários .....	43
5.2.4 Espermatócitos secundários .....	44
5.2.5 Espermátides .....	46
5.2.6 Células de Sertoli .....	48
<b>5.2.7 Lúmen</b> .....	<b>49</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A tuvira, conhecida também como peixe espada, sarapó, carapó, enguia e ituí, pertencem ao gênero *Gymnotus* spp., sendo peixes de porte médio, corpo alto e comprido, nadadeira anal longa e ânus, juntamente com a papila urogenital, próximas da base do opérculo (MINAS GERAIS, 2000; ROTTA, 2004).

Em Goiás, a tuvira tem grande preferência por pescadores amadores, sendo um dos peixes mais procurados em comércios de iscas vivas. Esta procura se justifica pelas atividades da pesca amadora e a pesca esportiva, que se encontram em constante crescimento.

A pesca amadora consiste em pescar o peixe e consumi-lo enquanto na pesca esportiva, há a captura do peixe e a devolução para a natureza. Possuem uma quantidade crescente de adeptos, envolvendo fatores culturais que tendem a ser passados por gerações.

Essas modalidades de pesca, ao movimentar recursos financeiros em todo mundo, possuem uma importância econômica relevante. O Brasil possui uma grande preferência por esta modalidade, principalmente nas regiões Norte e Centro-Oeste.

Tanto na pesca amadora, quanto na pesca esportiva, os impactos ambientais são grandes, envolvendo principalmente a captura exagerada de espécies (pesca amadora), a devolução de animais machucados e exauridos para a água (pesca esportiva) e a poluição por pescadores que deixam no meio ambiente resíduos oriundos de sua recreação.

Na região do rio Araguaia, em Goiás, uma grande parte dos pescadores, não tem consciência de que são usuários dos recursos oferecidos pelos rios, demonstrando descaso ao meio ambiente utilizado em sua recreação (CARVALHO & MEDEIROS, 2005).

Além das espécies pescadas, existem as espécies utilizadas como isca viva, são elas o lambari (*Astyanax bimaculatus*), muçum (*Synbranchus marmoratus*), tuvira (*Gymnotus* spp.) entre outros. Dentre estas espécies a tuvira se destaca como a principal preferência de isca viva pelos pescadores.

Moraes e Espinosa (2001), concluíram que as iscas mais utilizadas na região de Corumbá, Mato Grosso do Sul, é o caranguejo e cinco peixes de pequeno a médio porte sendo eles: a tuvira (*Gymnotus* spp.) a piramboia (*Lepdosiren paradoxa*), o cascudo (*Hypostomus uruguayensis*), o jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) e o muçum

(*Synbranchus marmoratus*). Os mesmos autores observaram que entre as pessoas envolvidas na captura de iscas vivas, 97% alegaram capturar a tuvira e 88% capturavam caranguejo.

A pesca de tuviras, vem resultando em diminuição de sua população, onde animais adultos e aptos a reprodução, possuem maior valor comercial. Como agravante, a tuvira vive em ambientes semelhantes ao de serpentes, tornando o ambiente de sua captura perigoso, principalmente para populações ribeirinhas, onde seus trabalhos em isqueiros, são comuns.

Além do exposto, após a captura, há uma intensa mortalidade dos animais capturados. Moraes e Espinoza (2001), constatou que somente na região de Corumbá, Mato Grosso do Sul, são extraídas cerca de 15 milhões de iscas ao ano. Destas, 14% acabam morrendo por manejo, coleta e/ou transporte inadequado.

Faz-se necessário, diante o exposto, a criação destes animais em cativeiro, onde os benefícios são: preservação da espécie através de diminuição da sua captura, o repovoamento em áreas excessivamente exploradas e preservação do habitat da espécie quando sua criação evita a sua captura no meio.

Estudos sobre a biologia reprodutiva de *Gymnotus*, vem sendo realizados nos últimos anos (ROTTA, 2004; COGNATO, 2005, 2006; FRANÇA 2010a, 2010b). Porém, não há relatos, de estudos, envolvendo a criação de tuviras em cativeiro seguida de reprodução artificial.

Em cativeiro, os peixes chegam à maturidade sexual, mas como não têm todos os estímulos que teriam na natureza (ex.: subir correntezas, temperatura, chuvas, foto período longo, presença do parceiro etc.), estes não conseguem expelir seus produtos sexuais (óvulo e sêmen). Ocorrendo a necessidade da intervenção do homem para realizar a reprodução artificial (PADUA, 2001).

A reprodução artificial pode ser obtida promovendo uma simulação da resposta endócrina natural, utilizando substâncias análogas aos estímulos hormonais ou a manipulação ambiental (ANDRADE & YASUI, 2003). A indução hormonal utilizando substâncias análogas aos hormônios naturais de peixes constitui uma excelente ferramenta na reprodução de peixes, principalmente se associada a manipulação ambiental.

O extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), a gonadotrofina coriônica equina (eCG) e análogos sintéticos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), representam indutores reprodutivos utilizados na criação de peixes.

O presente trabalho representa um estudo sobre a resposta do testículo de tuviras quanto a maturação final, após a aplicação dos hormônios eCG, GnRH e EBHC. Tal estudo tem a pretensão de abrir novos campos de pesquisa para a criação de iscas vivas em cativeiro.

## **2 OBJETIVOS**

A presente pesquisa tem por objetivo analisar aspectos histológicos de testículos de tuvira (*Gymnotus* spp.) submetida a reprodução artificial por diferentes indutores hormonais.

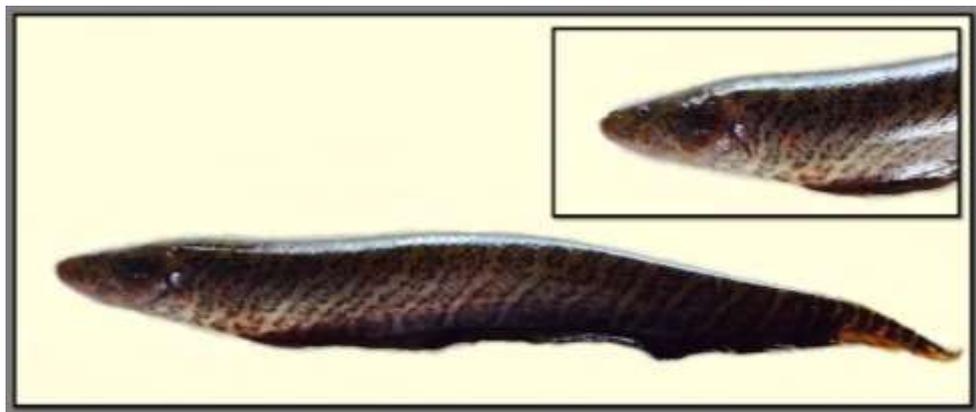
### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Caracterização da espécie estudada (*Gymnotus ssp*)

A *Gymnotus* spp. (Figura 01), popularmente conhecida como tuvira, peixe espada, sarapó, carapó e ituí, pertence a classe dos Actinopterygios, família Gymnotidae e a ordem Gymnotiformes (ROTTA, 2004).

A tuvira é um peixe de porte médio, alcançando cerca de 50 cm de comprimento e 300 gramas de peso. O corpo é alto e comprido, com olhos pequenos. A prognatismo é uma das peculiaridades, ficando a fenda bucal em posição superior. A abertura branquial é diminuta. A nadadeira caudal está ausente, com pedúnculo caudal terminando em ponta. A nadadeira anal é longa e composta de numerosos raios, ficando o ânus bem próximo à cabeça. As nadadeiras ventrais, bem como a dorsal, são ausentes, usando a longa nadadeira anal para se locomover (Figura 01) (MINAS GERAIS, 2000).

Figura 1: Características externas da tuvira, *Gymnotus spp*. Na cabeça é possível visualizar os pequenos olhos e a prognatismo da espécie (detalhe no canto direito superior).



Arquivo pessoal.

São peixes com órgãos elétricos, emitindo pequenas descargas elétricas que atuam na sua eletro comunicação, principalmente na fase reprodutiva. Além da eletro comunicação, a tuvira utiliza o campo elétrico formado por estas pequenas descargas, para a sua orientação, compensando sua ausência de visão (WESTBY, 1975 *apud* ROTTA, 2004).

São peixes de clima neotropical, habitando águas com temperaturas entre 22 e 28°C, podem ser encontradas do sul do México até o Brasil. No Brasil, são encontradas no Estado de Goiás - GO, Mato Grosso - MT, Mato Grosso do Sul - MS, Minas Gerais - MG, Rio de Janeiro - RJ e São Paulo - SP (CASCIOTTA et al, 2012).

Quanto ao microhabitat, vivem em ambientes lênticos, com teores baixos de oxigênio, ricos em matéria orgânica, com a cobertura de vegetação aquática rica em insetos.

A tuvira é um peixe carnívoro que se alimenta de peixes menores e insetos. Segundo Menin (1989), a presença de uma ampla fenda bucal nestes peixes, a cavidade bucofaringeana com dentes orais desenvolvidos e dentes na região faringeana pouco desenvolvidos, são característicos de um peixe com preferência alimentar por outros animais.

As tuviras possuem lábios que sugerem, pelo menos parcialmente, uma capacidade de se alimentar de organismos retirados do substrato. Seus lábios possuem capacidade de selecionar e capturar insetos (MENIN, 1989).

O *Gymnotus carapo*, tuviras, se reproduzem nos meses de Outubro a Dezembro, em épocas de enchente dos rios (MINAS GERAIS, 2000). Cognato (2005), em pesquisas realizadas na lagoa Verde do Parque Estadual de Itapuã, Rio grande do Sul relatou um período reprodutivo maior entre os meses Novembro a Março.

São peixes de desova parcelada ou sincrônico em mais de dois grupos. Segundo Vazzoler (1996), a desova parcelada se caracteriza por um mecanismo, onde determinadas espécies, produzem um número maior de ovócitos em um dado período de reprodução. Este de número de ovócitos é mais elevado que o esperado para o porte da espécie, levando em consideração a relação comprimento do peixe e fecundidade.

Neste mecanismo de desova, ao lado do lote de ovócitos do estoque de reserva, existem lotes de ovócitos em distintas fases de desenvolvimento, sendo que os ovócitos que compõem estes lotes se desenvolvem sincronicamente e, à medida que os lotes mais desenvolvidos atingem a maturação completa, são eliminados (VAZZOLER, 1996).

O ato dos machos cuidarem dos ovos, cavando fundo para o depósito dos mesmos, justifica a baixa fecundidade das fêmeas e o pequeno desenvolvimento testicular dos machos. A fecundidade é o número de ovócitos que completam o seu desenvolvimento e são eliminados em cada desova (RESENDE et al, 2006).

### 3.2 Importância da reprodução artificial

A reprodução natural dos peixes criados em cativeiro dificilmente acontece devido o eixo reprodutivo dessas espécies ser diretamente dependente das condições ambientais, como fotoperíodo, temperatura da água, pluviosidade, correnteza, enchentes entre outros (COSTA, 2012; ANDRADE, 2003).

Os sinais ambientais são traduzidos em alterações endócrinas que controlam a gametogênese. Alterações nessas condições afetam o processo reprodutivo, pois influenciam o sistema endócrino em diferentes níveis do eixo pineal-hipotálamo-hipófise-gônada.

Um dos maiores desafios enfrentados pela piscicultura é a reprodução de peixes. Trabalhos vêm sendo desenvolvidos no sentido de potencializar e viabilizar cada vez mais esta parte da cadeia produtiva.

O desenvolvimento das técnicas de indução de peixes alavancou a produção de alevinos no mundo, fornecendo suporte para produção de alevinos destinados ao cultivo. A forma jovem dessas espécies era dependente de sua captura na natureza, porém, o conhecimento da fisiologia da reprodução associado aos estudos de biologia de peixes, permitiu a determinação de procedimentos de manejo que permitem a indução dos processos de maturação final dos gametas e a subsequente fertilização (ZANIBONI e WEINGARTNER, 2007).

A hipótese de se reproduzir peixes em cativeiro começou a ser reputada em 1930 na Argentina. No Brasil, em 1935, Rodolpho Von Ihering, utilizou hormônios naturais presentes na hipófise de peixes maduros. Essa técnica continua sendo uma das alternativas utilizadas para induzir a reprodução de peixes migradores em todo mundo, sendo conhecida como “hipofisação” (PILLAY, 1995).

No desenvolvimento de técnicas reprodutivas, grande número de produtos vem sendo produzidos e com eles inúmeros protocolos de indução. Alguns exemplos, são os hormônios naturais (ex.: Extrato Bruto de Hipófise), os hormônios sintéticos (ex.: análogos de GnRH-a) e medicamentos inibidores de dopamina (ex.: domperidona, pimizida e metoclopramida).

A ação destes medicamentos é variada, podem atuar em nível gonadal, como é o caso das gonadotrofinas e os macerados de hipófises desidratadas. Podem ainda ser utilizados para antecipar o período reprodutivo, sincronizar a reprodução de matrizes de um mesmo lote, aumentar a produção seminal, entre outros. A ação

destes medicamentos visa sempre uma maior eficiência reprodutiva e uma consequente lucratividade. (ANDRADE e YASUI, 2003).

Todas essas técnicas tem como propósito o sucesso na ovulação e espermição das espécies de peixes com potencial econômico (COWARD et al., 2002).

### **3.3 Mecanismos neuroendócrinos na reprodução de peixes**

A reprodução é um processo fisiológico, estacional, resultante da integração de fatores oriundos de sistemas sensoriais. Estes fatores geram uma resposta hormonal denominado eixo pineal-hipotálamo-hipófise-gônada. Este evento é crucial para o desencadeamento de processos fisiológicos complexos que resultam na origem de uma prole (CUETO, 2009).

A reprodução de peixes é marcada pelo seu caráter cíclico, sendo regulado por fatores ambientais, como temperatura e fotoperíodo. No hemisfério sul, a relação dia/noite é caracterizada por dias mais longos e noites mais curtas no verão. No inverno os dias são curtos e as noites longas. Na primavera e no outono os dias e noites são medianos.

Em resposta as variações cíclicas do ambiente, os peixes têm apresentado formas de adaptação a época do ano mais favoráveis a reprodução. O fotoperíodo juntamente com outros fatores como temperatura, pluviosidade, salinidade, presença de outros indivíduos, densidade de população, proporção de sexos, são controladores dos bio-ritmos circadianos, essenciais no desencadeamento da gametogênese, na determinação da maturação gonadal e na desova dos peixes (NAVARRO e NAVARRO, 2012).

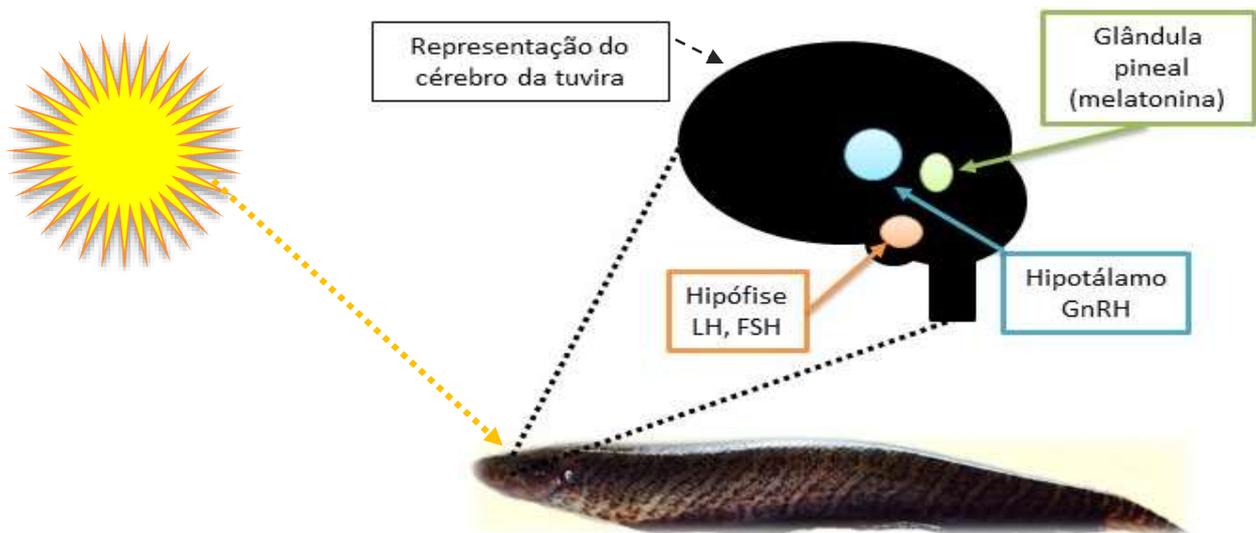
Na maior parte das regiões brasileiras, a maioria das espécies nativas reproduzem durante a primavera e o verão, que corresponde aos períodos chuvosos. As frequências reprodutivas analisadas revelam que os estádios do ciclo reprodutivo apresentam diminuição ou interrupção do processo reprodutivo nos meses mais frios do ano, junho e julho, sendo considerado período de repouso reprodutivo (BALDISSEROTTO, 2013).

Os peixes dispõem de sistemas sensoriais e receptores específicos responsáveis pela percepção dos estímulos ambientais. Quanto as estruturas receptoras, a glândula pineal é importante na reprodução de peixes, está localizada

na linha média do encéfalo, entre o telencéfalo e o eixo óptico (EKSTRÖM e MEISSEL, 1997; FALCÓN *et al.*, 2007).

Ela é responsável pela percepção da informação do fotoperíodo e temperatura, levando essas informações ao hipotálamo, desencadeando o processo reprodutivo. O sinal é captado através das células da retina dos olhos, conhecidas como cones e bastonetes, e transmitido a glândula pineal (Figura 02). A informação neural da retina e da glândula pineal é transmitida ao diencéfalo ventral pelo trato retino hipotalâmico e pela pineal. Esta mensagem gera uma indicação do comprimento do dia assim como variações na iluminação do ambiente (FALCÓN *et al.*, 2010).

Figura 2: Esquematização dos mecanismos neuroendócrinos no cérebro da tuiara.



Arquivo pessoal.

A informação humoral é marcada pela liberação de melatonina cujo ritmo de liberação e intensidade de produção sinalizam ao organismo o comprimento do dia e a estação do ano. A melatonina é um neurotransmissor produzido e secretado pelas principais células da glândula pineal, os pinealócitos (NAVARRO, 2010).

A melatonina é produzida em menor parte pela retina, mediando a maioria das atividades rítmicas circadianas e estacionais dos vertebrados, apesar dos mecanismos de ação dessa via serem praticamente desconhecidos (CUETO, 2009).

Há relatos que a concentração de melatonina é fortemente correlacionada ao fotoperíodo nos salmonídeos, fato este que resulta no atraso ou avanço do tempo de

desova, sugerindo que a melatonina atua como um regulador do comportamento reprodutivo (BROMAGE et al., 2001).

Da mesma forma, Amano et al. (2000) afirmam que a melatonina influencia nos sinais de fotoperíodo no controle de desenvolvimento gonadal em salmão (*Oncorhynchus masou*) e que essas alterações do fotoperíodo são interpretadas pelos ritmos de melatonina, que transferem essa informação para o encéfalo regulando a secreção do hormônio folículo estimulante – FSH e hormônio luteinizante – LH pela hipófise, fator determinante no desenvolvimento gonadal e maturação de gametas.

A hipófise nos peixes é a glândula responsável pela produção de gonadotrofinas (FSH e LH), que por sua vez desencadeiam o processo de maturação e recrutamento de gametas. A sinalização entre esses hormônios e as gônadas são consequência da aderência entre gonadotrofinas e receptores celulares na superfície das células foliculares, células de Leydig e Sertolli, sendo a primeira nos ovários e as duas últimas nos testículos. (BORELLA et al., 2014).

A síntese e secreção das gonadotrofinas são reguladas pelos hormônios liberadores de gonadotrofinas – GnRHs. São hormônios que possuem em sua estrutura, uma família de peptídeos cerebrais, cuja natureza e diversidade já são bem estabelecidas em peixes (SHERWOOD et al., 1993; LETHIMONIER et al. 2004).

As GnRHs representam o principal fator de liberação das gonadotropinas, e são sintetizadas e secretadas no hipotálamo, chegando até a hipófise através de conexões neurais diretas. A chegada das GnRHs nas membranas celulares gonadotróficas desencadeia uma série de reações intracelulares que estimulam a síntese e secreção de FSH e LH (KITAHASHI et al., 2013).

As gonadotrofinas são responsáveis pelo processo de gametogênese gonadal em todos os animais vertebrados. O FSH é responsável pela preparação das gônadas para ação do LH, que por sua vez, influencia diretamente na maturação final dos ovócitos e espermatozoides. Entretanto, são poucos os estudos que esclarecem a atividade do FSH e LH no que diz respeito a sua função (TRUDEAU, 1997; YARON et al., 2003).

### **3.4 Espermatogênese**

A espermatogênese é um processo complexo que pode ser definido como um evento de proliferação celular, onde as espermatogônias se multiplicam por mitose e

posteriormente meiose seguida de diferenciação das células filhas em espermatozoides. É um processo que envolve células diploides originando células haploides (BALDISSEROTTO, 2009).

Schulz e Miura (2002), citaram três grandes fases no processo de espermatogênese: a proliferação mitótica das espermatogônias, a divisão meiótica dos espermátocitos e a espermiogênese. Sendo a última, uma reestruturação das espermátides em espermatozoides, células flageladas.

#### 3.4.1 Proliferação mitótica das espermatogônias

A espermatogênese se inicia no epitélio dos túbulos seminíferos, a partir das espermatogônias (GRIER, 2002). A distribuição das espermatogônias podem classificar os testículos em espermatogoniais irrestritos e restritos. Nos testículos espermatogoniais irrestritos, as espermatogônias podem ser encontradas em toda a extensão do órgão. Os testículos espermatogoniais restritos, possuem espermatogônias restritas na região distal dos túbulos seminíferos (GRIER, 1981).

As espermatogônias se auto renovam por processos mitóticos que garantem a produção contínua dos gametas (GRASSIOTTO e ISHIBA, 2013). O desenvolvimento destas células depende das células de Sertoli, que envolvem as células germinativas e desenvolve atividades secretoras de hormônio (SCHULZ e MIURA, 2002).

A célula inicial no processo de espermatogênese é chamada de espermatogônia primária ou espermatogônia-A. Schulz (2002), mencionaram não haver diferenças morfológicas e moleculares entre as gerações de espermatogônias primárias.

Segundo Grassiotto e Ishiba (2013), a divisão mitótica da espermatogônia tipo A dentro do cisto, origina um grupo de células denominadas espermatogônias secundárias ou do tipo B que, depois de um número espécie-específico de divisões mitóticas, diferenciam-se em espermátocitos primários, iniciando a fase meiótica ou espermatocitária.

Em peixes guppy (*Poecilia reticulata*), por exemplo, foi constatado que as espermatogônias passam por aproximadamente dez ciclos mitóticos antes de uma divisão meiótica (BILLARD, 1969 apud SCHULZ e MIURA, 2002). Em zebrafish (*Danio rerio*), foram observadas em torno de cinco a seis divisões mitóticas, antecedendo a meiose (EWING, 1972 apud SCHULZ e MIURA, 2002).

Não foi encontrado, até a presente pesquisa, relatos sobre a quantidade de divisões mitóticas de espermatogônias dos peixes do gênero *Gymnotus* spp.

#### 3.4.2 Proliferação meiótica dos espermatócitos

A última geração de espermatogônias B a sofrer meiose, são chamadas de espermatócitos. Estas células iniciarão a fase espermatocitária.

Durante a fase meiótica ou espermatocitária, os espermatócitos sofrem modificações dando origem a dois eventos celulares especializados, a meiose I e II. Os espermatócitos primários, são as células que sofrerão meiose I, conhecida como reducional, onde os cromossomos homólogos são separados (Schulz et al., 2010).

Segundo o autor, os espermatócitos secundários passarão pelo processo de meiose II, um mecanismo equacional, onde as cromátides irmãs são separadas, dando origem a quatro células haploides, denominadas espermátides, detendo a cópia de cada cromossomo.

É importante ressaltar que um dos principais objetivos da meiose é gerar diversidade genética através de dois eventos, a recombinação gênica (crossing-over) e a segregação dos cromossomos homólogos (ALBERTS et al., 2002).

A recombinação genética ocorre na meiose I onde há a separação dos cromossomos homólogos. Durante este processo de separação, alguns genes destes cromossomos acabam sendo trocados, originando um evento denominado crossing-over). A segregação destes cromossomos, originarão duas células filhas geneticamente diferentes da célula mãe, gerando assim, a diversidade genética.

#### 3.4.3 Espermiogênese

A espermiogênese é embasada em uma série de transformações morfológicas, que acarretam na diferenciação de espermátides em espermatozoides (SHULZ et al., 2010).

As mudanças abrangem condensação nuclear, eliminação de organelas e citoplasma, formação do flagelo, e rearranjo das organelas celulares ao longo do citoplasma espermatozoidal (GRIER e URIBE-ARANZÁBAL, 2009).

No final da espermiogênese, quando as pontes intracelulares rompem-se e os espermatozoides são visualizados, os complexos juncionais entre as células de Sertoli

sofrem uma remodelação dinâmica, que termina com a abertura dos cistos e liberação dos espermatozoides para o lúmen tubular (BATLOUNI et al., 2005).

#### 3.4.4 Mecanismos neuroendócrinos da espermatogênese

No testículo, a espermatogênese depende diretamente das células de Sertoli e Leydig. Ambas as células, são estimuladas pelos hormônios gonadotróficos LH e FSH. As células de Sertoli possuem receptores para o FSH (FSHR) e as células de Leydig possuem receptores para o LH (LHR). A estimulação destas células pelos hormônios gonadotróficos leva a produção de vários fatores de crescimento que atuam nas células da linhagem germinativa (Figura 03).

Os hormônios andrógenos testosterona e 11-cetotestosterona, produzido pelas células de Leydig, se ligam as células de Sertoli através de receptores no núcleo e no citoplasma das mesmas e induzem a proliferação espermatogonial (Figura 03).

As células de Sertoli produzem um fator de crescimento, a activina B, que também induz a proliferação espermatogonial, porém em intensidade menor (SCHULZ e MIURA, 2002). Miura e Miura, 2003, relatam que a activina B, estimula a proliferação mitótica das espermatogônias B, sem entrar em meiose (Figura 03).

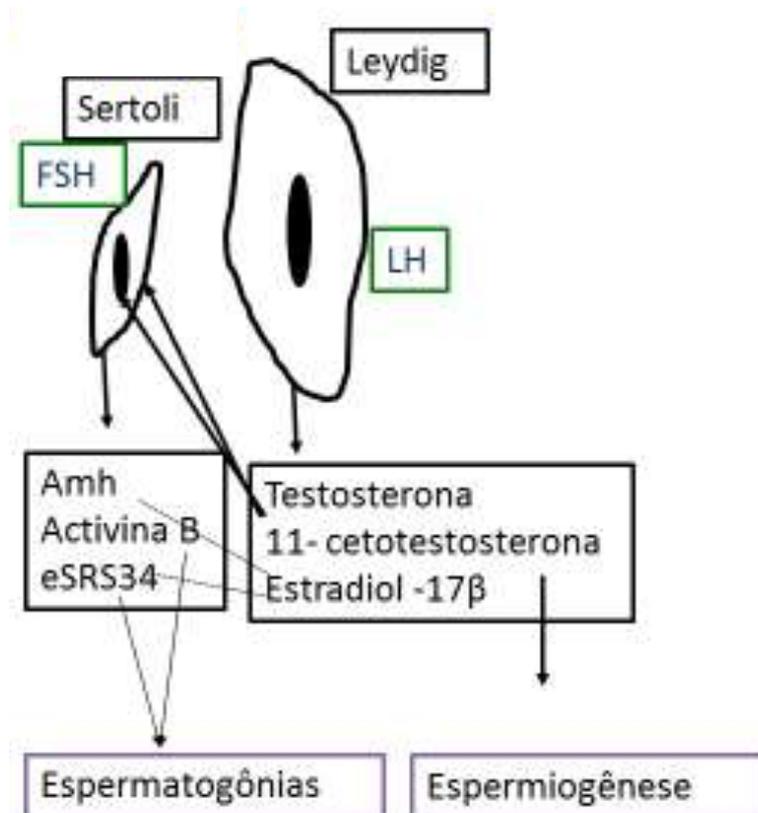
Além da testosterona, da 11-cetosterona, a activina B, as células de Sertoli produzem o fator de crescimento de célula endotelial derivado de plaqueta, também conhecido como PD-ECGF ou eSRS34 (do inglês eel Spermatogenesis Related Substance 34) e para alguns autores como fator de renovação das espermatogônias tronco. O PD-ECGF age influenciado pelo estradiol -17 $\beta$  (E2), secretado pelas células de Leydig e tem como função, renovar as espermatogônias tronco (Figura 03) (MIURA et al, 2003).

Estudos relacionados aos mecanismos neuroendócrinos da espermatogênese em peixes, são relativamente escassos e indicam particularidades espécie - específicas. Para tuviras não foi encontrado estudos quanto aos fatores de crescimento das células de Sertoli e Leydig.

O hormônio anti-mulleriano, ou SRS21 (eel Spermatogenesis Related Substance 21), também conhecido como substância inibidora da espermatogênese, deve ser considerado por bloquear a proliferação das espermatogônias tipo B e inibir a diferenciação espermatogonial. A ação deste hormônio é reprimida pela a 11-cetotestosterona, produzida pelas células de Leydig (Figura 03).

As gonadotrofinas (LH e FSH) são os hormônios responsáveis pela espermatogênese nas gônadas. O hormônio folículo estimulante – FSH, tem papel primordial no início da espermatogênese, no desenvolvimento das espermatogônias. O LH por sua vez, age crucialmente nos estádios finais da espermatogênese (BORELLA et al, 2014).

Figura 3: Esquemática dos mecanismos neuroendócrinos da espermatogênese. Representação das Células de Leydig e Sertoli dos testículos de tuviras.



Arquivo pessoal.

### 3.5 Estrutura dos Testículos

Na maioria dos teleósteos, as gônadas de machos e fêmeas, são órgãos pares, alongados, envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso (túnica albugínea), localizados dorsalmente na cavidade celomática (GODSIL e BYERS, 1944 apud RATTY et al, 1990). Em algumas espécies, os testículos se fundem em um único órgão (NAGAHAMA, 1983).

Em peixes fora do estado de maturação, os testículos se apresentam como estruturas delgadas. A medida que o peixe se aproxima do estado de maturação, os

testículos se tornam mais espessos e consistentes, adquirindo uma coloração amarelada (RATTY et al, 1990).

O ducto espermático possui localização dorsal posterior, terminando na papila urogenital, entre o reto e os ductos urinários (NAGAHAMA, 1983). De acordo com Koulish et al.(2002), os testículos possuem um compartimento intersticial ou intertubular e um compartimento germinativo ou tubular com funções espermatogênicas (produção de gametas) ou androgênicas (secretoras).

No compartimento intertubular observa-se os vasos linfáticos e sanguíneos, as células do tecido conjuntivo e nervoso, macrófagos, mastócitos e as células de Leydig.

O compartimento germinativo é composto pela membrana basal, células peritubulares mióides, células de Sertoli e as células germinativas. A membrana basal e as células peritubulares mióides formam a túnica própria, que reveste o túbulo externamente. As células de Sertoli e as células germinativas formam o epitélio seminífero (KOULISH et al. 2002).

A estrutura testicular dos teleósteos varia bastante de acordo com a espécie, porém, duas estruturas básicas podem ser definidas de acordo com a diferenciação do compartimento germinativo: lobulares e tubulares (BILLARD et al., 1982; NAGAHAMA, 1983).

O testículo lobular, o mais frequente, se caracteriza pela presença de inúmeros lóbulos, separados entre si por uma fina camada de tecido conjuntivo fibroso. Dentro dos lóbulos, as espermatogônias primárias sofrem divisões mitóticas, produzindo cistos, onde as células se encontram em um estado de maturação semelhante. A medida que a espermatogênese e a espermiogênese evoluem, os cistos sofrem expansão e ruptura, liberando os espermatozoides no lúmen dos lóbulos. A partir do lúmen lobular, os espermatozoides seguem para ducto espermático (NAGAHAMA, 1983). Apenas na região do ducto espermático pode-se observar a presença de anastomoses dos lóbulos (GRIER, 1993).

Os testículos tubulares são caracterizados por túbulos que formam alças ventro-laterais. Os túbulos podem sofrer anastomose em diferentes regiões, sendo a principal, a do ducto espermático. A presença marcante destas anastomoses podem originar a denominação de testículos tubulares anastomosados (GRIER, 1993). É caracterizado pela formação de alças e túbulos que se interconectam e se anastomosam, desde a periferia até a região do ducto testicular.

### 3.6 Indutores Hormonais

Diversos compostos, naturais ou sintéticos são capazes de atuar no eixo endócrino em diferentes níveis estimulando a maturação final dos gametas através de vários mecanismos. Esses compostos atuam diretamente nos receptores de hormônios endógenos, simulando os efeitos da ação de hormônios naturais, gerando reações em cascata, que culminam na espermatogênese.

O extrato bruto da hipófise de peixes maduros (EBH), é o hormônio natural mais antigo e mais utilizado na indução hormonal de peixes migradores brasileiros. (HOUSSAY, 1930; IHERING, 1935 apud ZANIBONI e WEINGARTNER, 2007).

Dentre os extratos brutos de hipófise, o de carpa é o mais utilizado e aceito. Há estudos com extratos bruto de anfíbios, aves, mamíferos e outras espécies de peixes. Porém a utilização do EBHC ainda é predominante.

Trabalhos utilizando hipófises de frango, pato e rã, apresentaram resultados satisfatórios e uma melhor relação de custo benefício, visto que o extrato bruto de hipófise de carpa apresenta valores comerciais elevados (NWADUKWE, 1993; STREIT JR., 2002).

O mecanismo de ação do EBHC está na ação das gonadotrofinas na maturação final das gônadas, considerando que concentrações de LH e FSH, permanecem na hipófise do animal doador (ZANIBONI e WEINGARTNER, 2007).

Após a maturação gonadal até o período de dormência, há grandes concentrações de gonadotrofinas na hipófise, sendo o pico de produção no final da vitelogênese. Neste período ocorre a coleta das hipófises dos animais doadores (ZANIBONI FILHO E BARBOSA, 1996; MORAIS FILHO e SCHUBART, 1955 apud ZANIBONI e WEINGARTNER, 2007).

Segundo estes mesmos autores, a aplicação deste hormônio complementa a quantidade de gonadotrofina não sintetizada naturalmente pelo peixe privado das condições ambientais favoráveis.

O EBHC possui como desvantagens o alto preço comercial, a possibilidade de transmissão de doenças, reações imunes e ausência de dosagem exata das gonadotrofinas. Como vantagens, pode-se citar os resultados satisfatórios na espermiacção e ovulação, na possibilidade de um efeito sinérgico causado por outros hormônios presentes na hipófise e na facilidade em aplicar e acondicionar o hormônio (ANDRADE, 2012).

Vários trabalhos associaram o uso do EBHC com outros hormônios, visando garantir e potencializar a ovulação e espermição, além de reduzir custos. (LEVAVI-SIVAN et al., 2004; SZABÓ et al., 2002; WEN e LIN, 2004; ANDRADE-TALMELLI et al., 2002).

Os hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH), vem sendo muito estudado nas últimas décadas. O GnRH é formado por uma molécula simples, o que permite a síntese de novas moléculas, com suas estruturas alteradas, formando compostos de 50 a 100 vezes mais potentes (HARVEY E CAROLSFELD, 1993). Estes compostos são conhecidos como os análogos dos hormônios liberadores de gonadotrofina (GnRH-a).

Existem vários análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH-a) sendo utilizados na indução de peixes, entre os principais pode-se citar o análogo do GnRH de mamíferos (mGnRH-a) e o análogo do GnRH de salmão (sGnRH-a).

A utilização do GnRH-a tem mostrado resultados satisfatórios em vários trabalhos, exceto para peixes do gênero *Brycon*, que não apresentaram desova (RAMOS et al., 1997; BERNARDINO e FERRARI, 1987; ZANIBONI FILHO e BARBOSA, 1996)

Dentre os análogos dos hormônios liberadores de gonadotrofina (GnRH), a busserelina é bastante aceita no mercado, apresentando resultados satisfatórios, porém com eficiência reduzida quando comparado aos análogos de salmão e mamífero (CURRY e TSUKAMOTO, 1988; MÉNDEZ e RODRIGUEZ, 1989).

As vantagens em se utilizar o GnRH, estão na presença de uma molécula sem ação espécie-específica; ausência de uma resposta imune do peixe receptor e ausência na transmissão de doenças. Por se tratar de uma molécula sintética, o GnRH permanece um maior tempo na corrente sanguínea estimulando a hipófise a produzir os hormônios LH e FSH resultando em uma espermatogênese criada por gonadotrofinas endógenas (ZOAR E MYLONAS, 2001).

A gonadotrofina coriônica equina – eCG, possui poucos estudos quanto a sua utilização em peixes. Estudos utilizando somente a gonadotrofina coriônica humana – hCG ou a associando com o extrato bruto de hipófise de carpa – EBHC são mais frequentes.

A gonadotrofina purificada de origem humana possui uma capacidade indutora eficiente, porém não se estende a todas as espécies. As diferenças moleculares entre as gonadotrofinas humana e de peixe, levam a utilização de altas doses do hCG e a

diminuição no desempenho reprodutivo de peixes a longo prazo (HARVEY E CAROLSFELD,1993).

Pereira (2006), utilizando a gonadotrofina coriônica equina em *Prochilodus lineatus*, constatou que este hormônio pode substituir o EBHC. O eCG age no animal de forma análoga ao hormônio folículo estimulante-FSH e ao hormônio luteinizante-LH, porém, predominantemente ao FSH (Hafez, 2004). A mesma molécula de eCG possui capacidade de se ligar aos receptores de LH e FSH, nas células de Leydig e Sertoli, respectivamente.

Um método essencial e relevante para análise dos tipos celulares em cortes de testículos é a histologia. Segundo Santelli (2003), a análise microscópica de cortes de tecidos e órgãos compõem o estudo da histologia.

Através de cortes histológicos é possível identificar as células da linhagem espermatogênica, as células de Sertoli, as células de Leydig, a estrutura testicular, assim como estruturas intra e intertubulares.

A quantidade destas células e as características das estruturas dos testículos, fornecem indícios do estágio gonadal dos peixes, possíveis anormalidades e características específicas que cada espécie possa apresentar.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Captura

Para o desenvolvimento deste trabalho foram capturadas sessenta tuviras, *Gymnotus* spp., de aproximadamente  $40g \pm 10g$ . As tuviras foram capturadas no lago do Tijuqueiro (Figura 04), na cidade de Morrinhos –GO em Outubro de 2013, pela técnica da captura de chama descrita por Banducci Júnior et al (2000) modificada.

Figura 4: Vista aérea do Instituto Federal Goiano- Campus Morrinhos e do lago Paranoá (indicado pela seta).



Imagens retiradas do programa Google Earth – Google em 10/02/2015

As espécies do gênero *Gymnotus* são dificilmente diferenciadas devido ao grande número de espécies crípticas (COGNATO, 2005). A dificuldade na separação de uma espécie específica, leva a grande maioria dos autores a trabalharem com *Gymnotus* spp.

As tuviras foram transportadas para a estufa do setor de piscicultura da PUC - Goiás. Foi utilizado para o transporte, caixa transportadora com capacidade para 400 L, cilindro de oxigênio comprimido, fluxômetro e mangueiras acopladas em pedras porosas. Os peixes foram acondicionados durante o período de dezembro de 2013 a fevereiro de 2014, passando por um período de adaptação ao cativeiro de 90 dias.

## 4.2 Delineamento e condições experimentais

Utilizando delineamento inteiramente casualizado, foram definidos quatro tratamentos com dez repetições ou seja, dez animais por caixa, sendo cada animal uma repetição. Foram utilizadas quatro caixas d'água de 500 l, contendo aproximadamente 400l (0,4 m<sup>3</sup>) dotadas de sistema air lifting (Figura 05).

O sistema air lifting foi criado simulando os sistemas de manutenção da qualidade da água aquários. Neste sistema, foi utilizada uma grade plástica fixada a 25 centímetros do fundo (Figura 05). No centro deste suporte foi inserido uma estrutura de cano pvc de meia polegada em formato de "T".

Na estrutura feita de cano pvc, foi inserido na extremidade final (fundo do balde) uma pedra porosa acoplada a uma mangueira e ligada a um compressor eletromagnético com vazão aproximada de 110 l/min. Para filtragem da água, foi colocado no fundo do balde (abaixo da grade) dez unidades de bobes para cabelos.

Acima da grade, foi colado pedras e manta acrílica. Os bobes, as pedras e a amanta acrílica teriam função de filtrar a água enquanto a injeção de ar dentro do cano localizado no fundo do balde, faria a água se tornar aerada e mais leve, subindo pela estrutura em forma de "T", oxigenando a água (Figura 05).

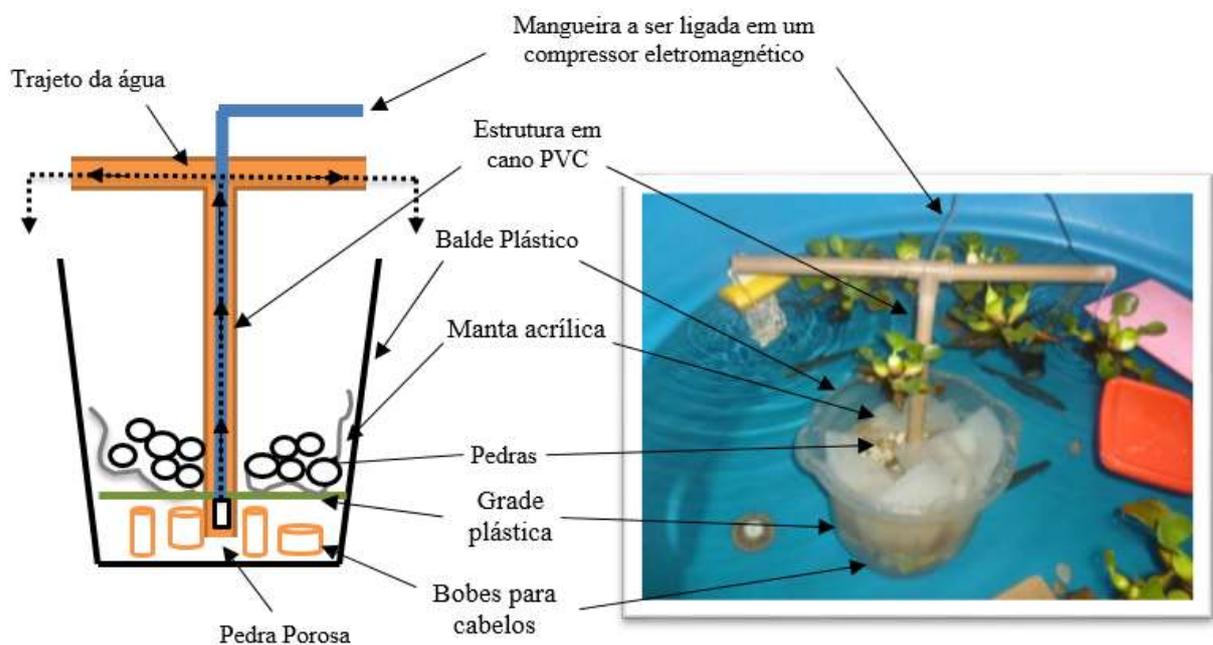
Cada caixa, foi aquecida com dois termostatos regulados para uma temperatura de 28°C. Elementos vazados, aguapés e uma placa de EVA flutuante foram colocados nas caixas afim de simular os camalotes naturais. As caixas foram sifonadas sempre que necessário.

As determinações de oxigênio dissolvido, pH, condutividade e amônia foram realizadas utilizando reagentes padronizados para análises da água. Após a alimentação dos animais, a temperatura da água foi aferida em um ponto mediano da superfície, através de termômetros digitais. A alimentação foi realizada a tarde, utilizando-se uma massa homogênea contendo filé de tilápia e gelatina sem sabor. Gradativamente, foi incorporada ração Pirá Alevinos® à mistura até uma proporção final de 70% de ração e 30% de filé de tilápia.

Na primeira semana de adaptação das tuviras ao cativeiro, foi fornecido filé de tilápia triturado acrescido de gelatina sem sabor, na proporção de um quilo de filé para 36 gramas de gelatina. Na segunda semana, foi fornecida uma mistura contendo 800 gramas de filé de tilápia, 200 gramas de ração para alevinos e 36 gramas de gelatina sem sabor.

A substituição do filé de tilápia por ração para alevinos foi realizada em uma proporção de 20% a cada semana de cativeiro até uma proporção final de 70% de ração e 30% de filé de tilápia. As quantidades de gelatina sem sabor permaneceram constantes. Os peixes foram alimentados diariamente, ao fim da tarde, *ad libitum*. Foi fornecido 3% da biomassa da mistura por caixa em três pontos diferentes na superfície da caixa d'água, minimizando a disputa pelo alimento.

Figura 5: Caixa d'água dotada de sistema air lifting.



Arquivo pessoal.

### 4.3 Tratamentos experimentais

Para indução a reprodução da tuiuba, foram testados três hormônios e para o grupo controle, solução salina a 2%. Os utilizados foram: o extrato bruto de hipófise de carpa – EBHC, a gonadotropina coriônica equina – ECG e análogo sintético do hormônio liberador de gonadotrofina – GnRH-a. Os três hormônios foram aplicados em duas dosagens, sendo a primeira (preparatória) com a finalidade de promover a maturação total dos gametas e a segunda com a finalidade de liberação dos gametas.

A contenção dos peixes foi realizada com o auxílio de um pano molhado e manta acrílica. A aplicação dos quatro tratamentos foi realizada utilizando uma seringa de 1 mL, na musculatura dorsal anterior. O intervalo entre a primeira e segunda aplicação, para todos os tratamentos, foi de 12 horas.

Devido a ausência de dimorfismo sexual nas tuviras, foi estabelecido para os machos, a mesma dosagem hormonal indicada para as fêmeas. As tuviras não possuem diferenças sexuais externas (WESTBY, 1975 apud ROTTA, 2004), Rotta (2007) determinou o sexo de tuviras por imagens de ultrassom, alegando ser uma técnica eficiente, não evasiva e simples. Moreira (2010) mencionou em seus trabalhos, que alguns isqueiros consideram as tuviras machos, aquelas de coloração escura e fêmeas as de coloração mais clara. Porém, acredita-se que a cor da água seja o fator relacionado com a coloração das tuviras (ROTTA, 2007).

Para a aplicação do extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), o preparo seguiu a metodologia utilizada por Silva (2000). Foi utilizado a solução fisiológica para diluição do EBHC, previamente macerado em cadinho com três gotas de glicerina.

O EBHC foi aplicado na dosagem de 0,5 mg/kg na 1ª dose e 5,0 mg/Kg na 2ª dose (ANDRADE, 2003). A aplicação do análogo sintético do hormônio liberador de gonadotrofina, o diacetato tetrahidratado de gonadorelina (Cystorelin®) foi utilizado nas dosagens de 10 mcg e 100 mcg, sendo a primeira e a segunda aplicação, respectivamente (ANDRADE, 2012).

A aplicação da gonadotropina coriônica equina (Sincro eCG®) foi administrada nas dosagens de 500 UI na primeira e segunda aplicação. A diluição foi realizada em solução diluente fornecida e prescrita pelo laboratório de fabricação (PEREIRA, 2006).

#### **4.4 Análises Histológicas**

Para as análises histológicas, foram eutanasiados cinco machos de cada tratamento, por incisão e ruptura da medula dorsal após prévia desensibilização em água com gelo.

Os peixes foram eutanasiados no momento em que se esperava que se estivessem no estágio final de maturação gonadal. Para que isso ocorresse determinou-se a hora grau considerando-se que a tuvira é um peixe de águas doces tropicais.

A hora grau estipulada para o presente estudo foi de 250 horas graus, baseada em uma média para peixes de clima tropical, conforme descrito por Kubitza (2004). Para tuviras, não foi encontrado até a presente pesquisa estudos determinando sua hora grau.

Após eutanásia, os testículos foram avaliados e retirados através de secção ventral da cavidade celomática e armazenados rapidamente em solução fixadora de Bouin por vinte e quatro horas.

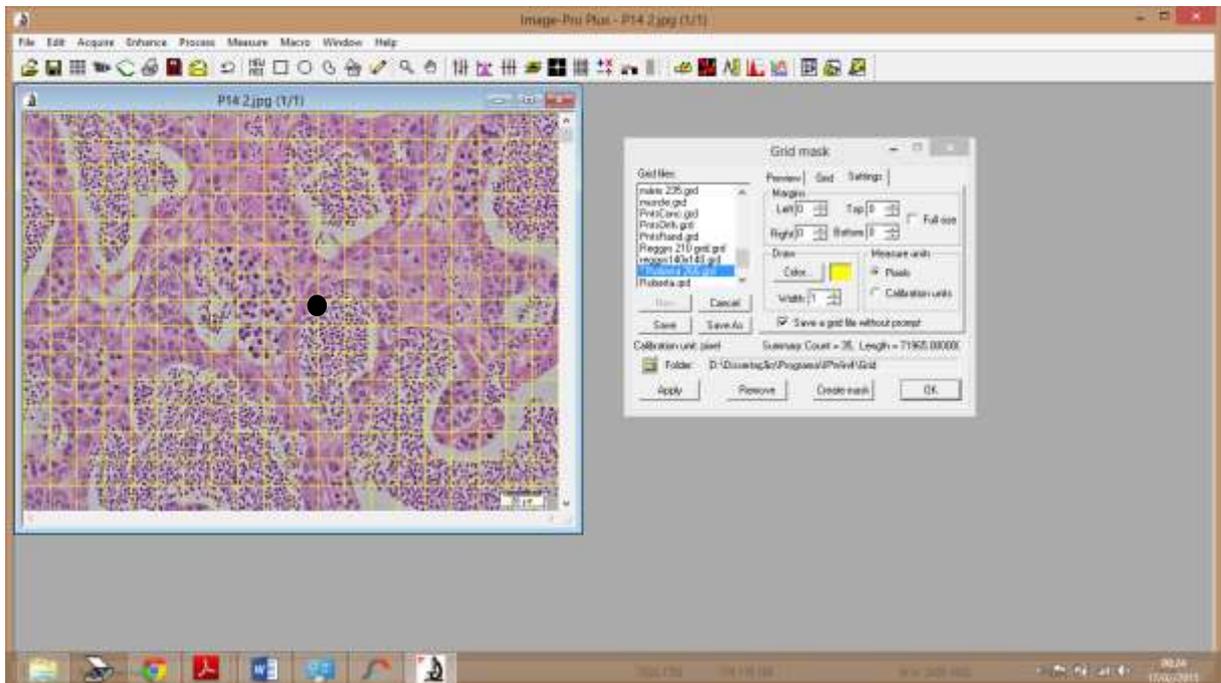
Após a fixação, os testículos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool até a diafanização em xilol, seguida de infiltração e inclusão em parafina. Foram obtidos vinte blocos, sendo cinco de cada tratamento. Em cada bloco foi feito três cortes de cinco micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) respeitando um intervalo mínimo de 40  $\mu\text{m}$  entre cada corte.

Para os cortes foi utilizado um micrótomo rotativo (Leica, RM 2255), onde cada corte teve lâminas em triplicata, totalizando nove lâminas por peixe. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina. Os processos de corte e coragem das lâminas foram realizados no Laboratório de Microbiologia da PUC-Goiás, no setor de Zootecnia.

As lâminas foram fotografadas no Laboratório de Sistemática Molecular da Universidade Federal de Viçosa, no Departamento de Biologia Animal. Foram fotografadas 15 imagens por peixe em fotomicroscópio (Olympus DP-73), onde destas, dez imagens foram analisadas utilizando o software Image-Pro Plus ®. As fotos foram tiradas em objetiva de 40x , com largura de 2400 pixels, altura de 1800 pixels e resolução geral de 72 dpi,.

A proporção volumétrica ocupada pelos componentes do parênquima testicular (túbulos seminíferos e tecido intertubular) foi determinada a partir da contagem de 2660 pontos projetados sobre dez imagens obtidas ao acaso, sendo 266 pontos em cada imagem (Figura 06).

Figura 6: Software Image-Pro Plus ® aplicando uma gradícula de 266 pontos sobre a imagem de uma lâmina. O ponto é determinado pela intersecção de uma linha vertical com uma linha horizontal (círculo negro evidenciado na imagem indicando um ponto).



Arquivo pessoal.

O programa consiste na aplicação de uma gradícula sobre cada foto das lâminas histológicas. Para cada intersecção de uma linha horizontal com uma linha vertical, determina-se um ponto a ser analisado, quantificando-se assim o percentual de pontos sobre túbulos seminíferos (túnica própria, epitélio seminífero e lume) e intertúbulo. Foram quantificadas as populações de espermatogônias do tipo A, do tipo B, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermátides e células de Sertoli (S).

Os dados obtidos foram analisados pela comparação de médias através do teste de TUKEY, executado pelo software Statistical Analysis System - SAS.

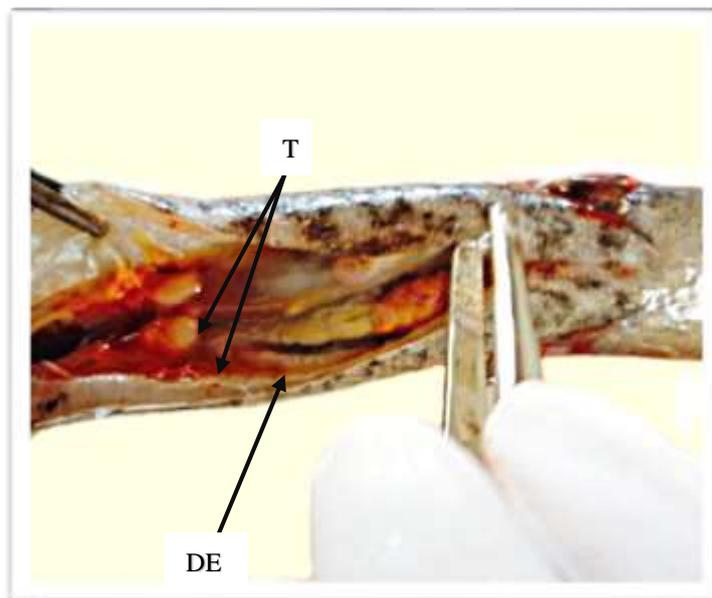
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Características anatômicas

Em todos os tratamentos os peixes foram eutanasiados e os testículos observados. Peixes induzidos e peixes do grupo controle, apresentaram testículos ovais de coloração amarelo-esbranquiçadas (Figura 07).

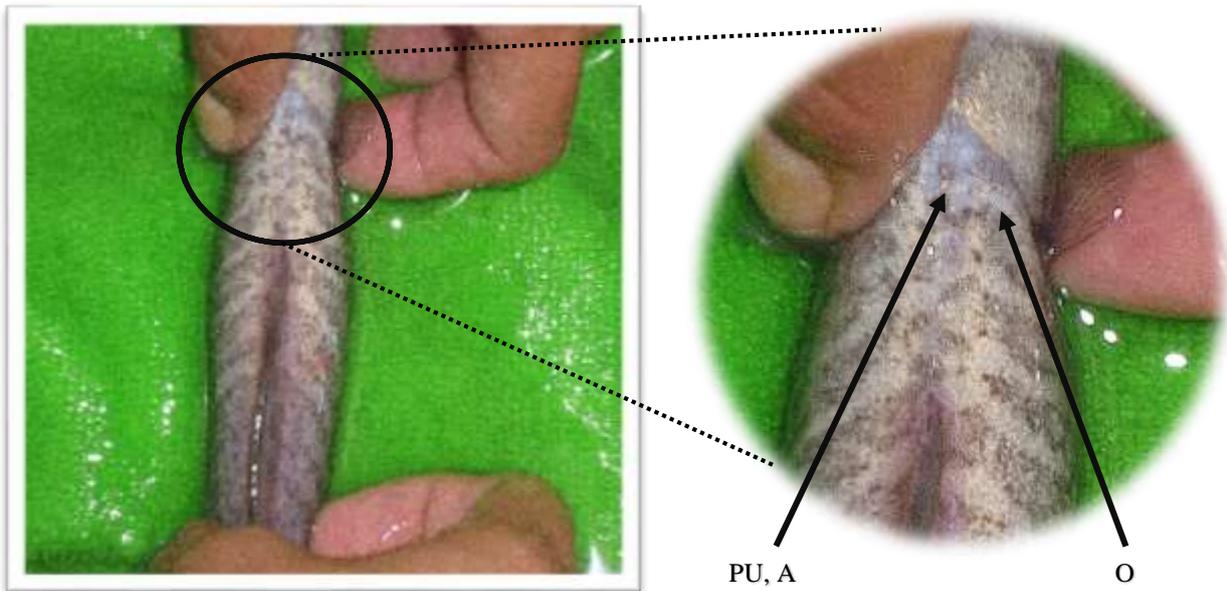
Foram identificados testículos em pares, consistentes, localizados ventralmente na cavidade celomática entre a extremidade cranial da bexiga natatória e a extremidade caudal do conjunto visceral. Os dutos espermáticos apresentaram-se longos e pares, emergindo na região cranial dos testículos e finalizando-se na papila urogenital, localizada abaixo da cabeça, ao lado do ânus, próxima a base do opérculo (Figura 08).

Figura 7: Interior da cavidade celomática de uma tuvira evidenciando os testículos (T) ovais de coloração amarelo esbranquiçadas, localizados ventralmente. Os dutos espermáticos (DE), estão localizados cranialmente aos testículos.



Arquivo pessoal.

Figura 8: Papila urogenital (PU), próxima a base do opérculo (O) ao lado do ânus (A).



Arquivo pessoal.

Garcia-Lopez menciona que na maioria dos teleósteos, os testículos são alongados e se localizam longitudinalmente e dorsalmente a cavidade celomática. As tuviras apresentam uma exceção pela posição ventral na cavidade celomática e o formato oval. (MOREIRA, 2010; FRANÇA, 2010a, 2010b; COGNATO, 2005; COGNATO 2006).

Em todos os tratamentos os testículos se apresentaram pequenos, ocupando um terço da cavidade celomática, mesmo em machos maduros (Figura 07). Virgílio et al, 2012; observou testículos pequenos independente da fase reprodutiva de peixes do gênero *Gymnotus*.

## 5.2 Características histológicas

Na análise histológica das lâminas de todos os tratamentos, foram observadas características comuns aos peixes do gênero *Gymnotus*, como testículos envoltos pela túnica albugínea que se apresentava composta por uma rede de fibras conectivas que invaginavam no interior do órgão, no tecido intersticial, delimitando e sustentando os túbulos seminíferos.

Os testículos foram classificados quanto a estrutura como tubular anastomosado, com regiões tubulares e intertubulares. Na região intertubular foram

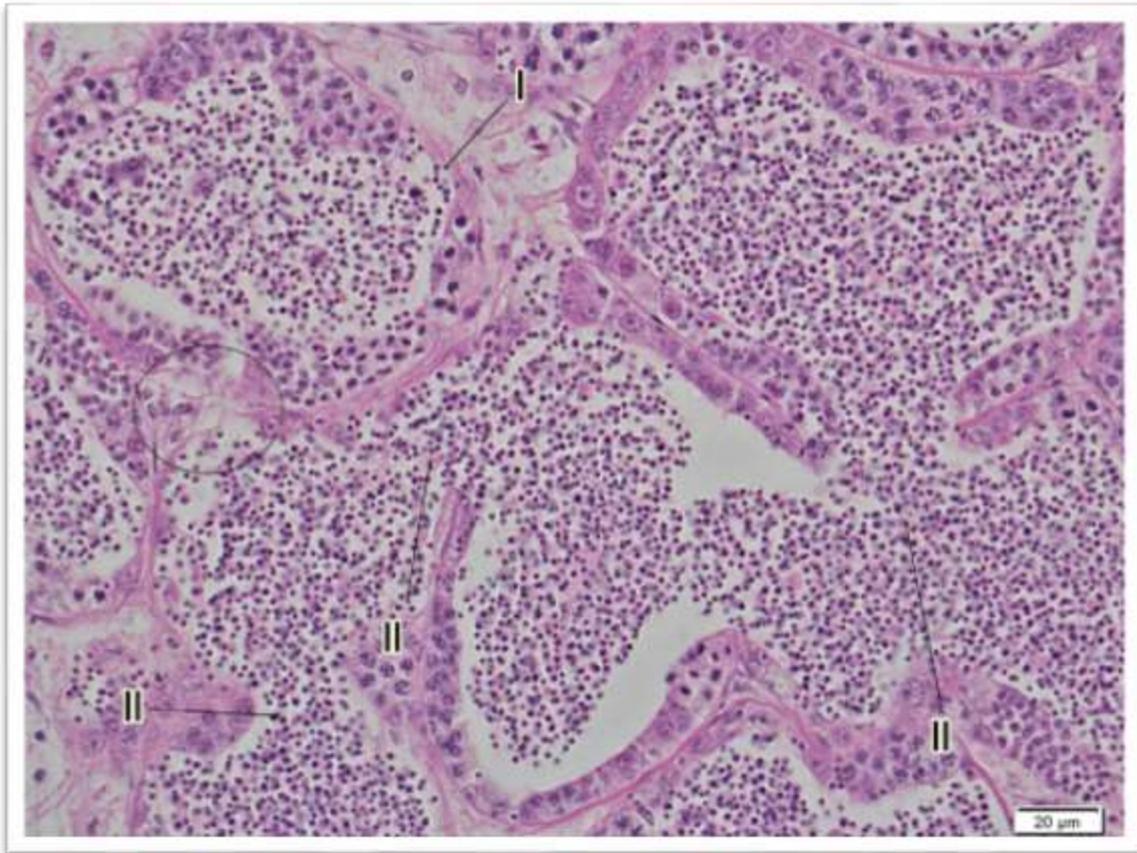
observadas células de Leydig, mióides, entre outras, enquanto na região tubular foram observadas células germinativas (espermatogônia A, espermatogônia B, espermátocito primário, espermátocito secundário, espermátide e espermatozoide) e células de Sertoli. Entre essas regiões encontra-se o epitélio germinativo, responsável pelas delimitações das mesmas.

Foi observado em todos os peixes, o testículo do tipo tubular anastomosado (Figura 09). Moreira (2010), França, (2010a), Cognato (2005) e Cognato (2006), encontraram a mesma estrutura testicular em estudos com *Gymnotus spp.* e *Gymnotus carapo*.

Vergílio et al (2012), estudando testículo maduros de *Gymnotus carapo*, observou a presença de testículos lobulares irrestritos (onde as espermatogônias foram observadas ao longo do túbulo). Apesar da classificação diferir do encontrado na pesquisa, o autor mencionou na presença de anastomoses no testículo do tipo lobular.

Com auxílio de microscopia óptica, foram identificadas seis diferentes tipos de células germinativas para todos os grupos de animais estudados: espermatogônias primárias, espermatogônias secundárias, espermátocitos primários, espermátocitos secundários, espermátides e espermatozoides (Tabela 01).

Figura 9: Corte histológico do testículo de tuvira induzida por GnRH indicando a presença de túbulos anastomosados (II) e um túbulo íntegro (I) iniciando processo de anastomose (região evidenciada).



*Arquivo pessoal.*

Os resultados sobre as células germinativas serão apresentados e discutidos por célula, levando em consideração os tratamentos e seguindo a ordem espermatogênica.

### 5.2.1 Espermatogônias A

As espermatogônias A, ou primárias, representam as células germinativas precursoras. Analisando todos os tratamentos, o grupo controle apresentou médias significativamente superiores ( $P > 0,05$ ) em relação aos demais tratamentos.

Entre os tratamentos, verificou-se que o hormônio liberador de gonadotrofina - GnRH-a, obteve valores significativos inferiores, seguido pela gonadotrofina coriônica equina - eCG e pelo extrato bruto de hipófise de carpa - EBHC (Tabela 1).

Tabela 1: Médias das proporções das células da linhagem espermatogênica, Sertoli e Lúmen, por tratamento.

Tratamento	Esp.A	Esp. B	Esp. I	Esp. II	Emi.	Sertoli	Lúmen
<b>Controle</b>	8.480 a	7.242 a	7.220 a	7.580 b	5.460 c	53.200 a	9.344 a
<b>EBHC</b>	4.100 b	8.724 a	6.280 a	11.500 a	4.880 c	41.200 ab	8.236 a
<b>eCG</b>	3.700 b	7.966 a	2.700 b	2.880 c	12.020 b	37.800 b	11.218 a
<b>GnrH</b>	2.060 b	69.42 a	1.960 b	4.480 bc	19.440 a	37.800 b	12.190 a
<b>CV%</b>	15,95	26,32	29,76	26,36	19,41	11,94	24,10

Esp.A= Espermatogônia A; Esp.B=Espermatogônia B; Esp.I=Espermatócito primário; Esp.II=Espermatócito secundário; Emi=Espermátide; CV=Coefficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

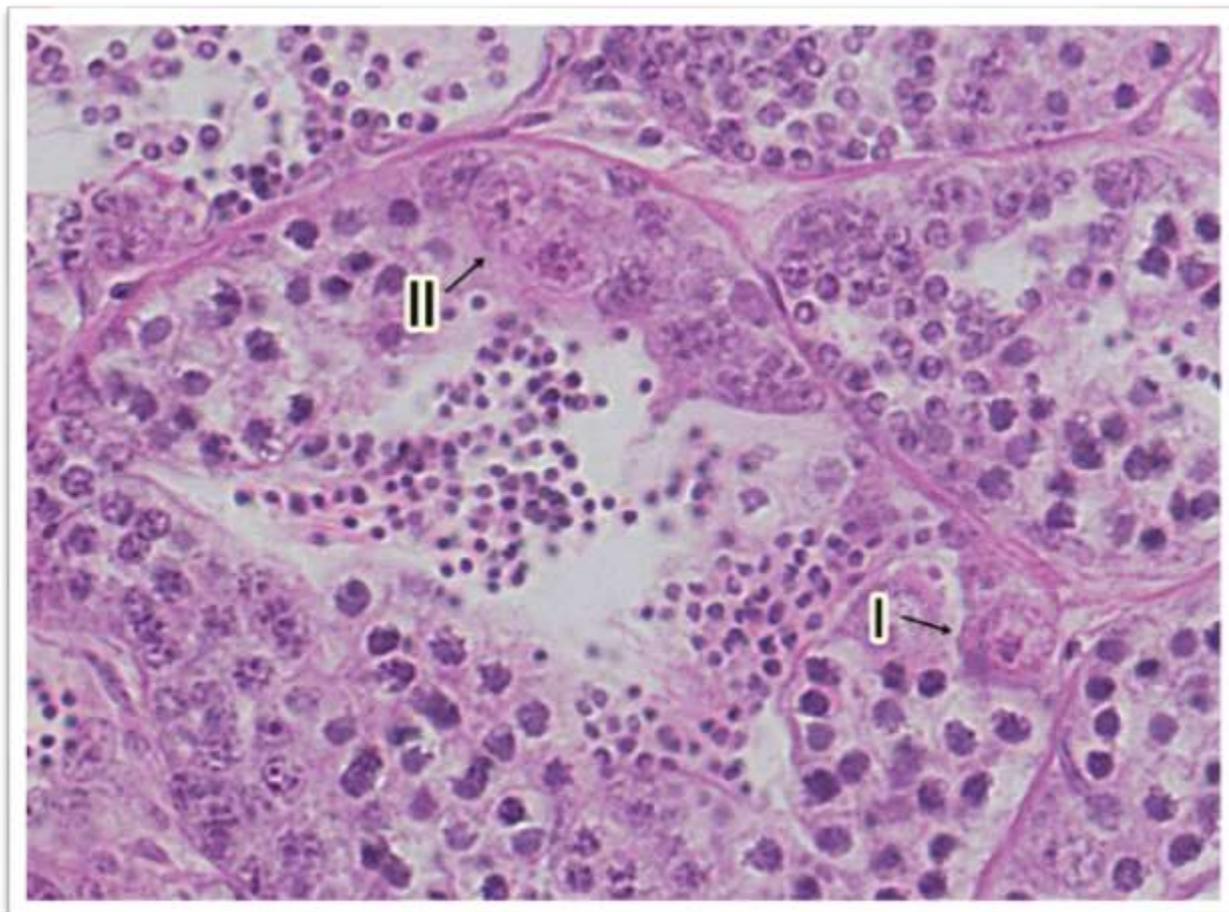
França (2010a), ao trabalhar com *Gymnotus sp.*, determinou cinco fases reprodutivas: regressão, maturação inicial, maturação intermediária, maturação final e regredida.

Segundo a autora, os cistos de espermatogônias A tendem aumentar a medida que os peixes se afastam da fase de maturação final, justificando a maior presença de espermatogônias primárias no grupo não induzido, o tratamento controle. Os tratamentos com indutores hormonais não apresentaram diferenças significativas entre si.

As espermatogônias A apresentaram maior tamanho em relação as demais células germinativas. Foram encontradas tanto isoladas como aos pares na parede dos túbulos seminíferos apresentando núcleo grande, esférico, localizado na região central do citoplasma, o citoplasma apresentou-se claro e abundante, cujo limite foi dificilmente notado na microscopia de luz (Figura 10). Resultados semelhantes foram encontrados para diversos estudos com tuviras (VERGÍLIO, 2012; MOREIRA, 2010; FRANÇA, 2010a, 2010b; COGNATO, 2005; COGNATO 2006).

Schulz, 2010, denominou espermatogônias A solteiras, como espermatogônias A indiferenciadas enquanto as células encontradas em pares, foram denominadas de espermatogônias A diferenciadas. O autor mencionou que o potencial de auto renovação diminui com a divisão mitótica, ficando este maior nas espermatogônias A indiferenciadas.

Figura 10: Corte histológico do testículo de tuvira do grupo controle indicando espermatogônia primária isolada (I) e par de espermatogônias primárias (II).



Arquivo pessoal.

### 5.2.2 Espermatogônias B

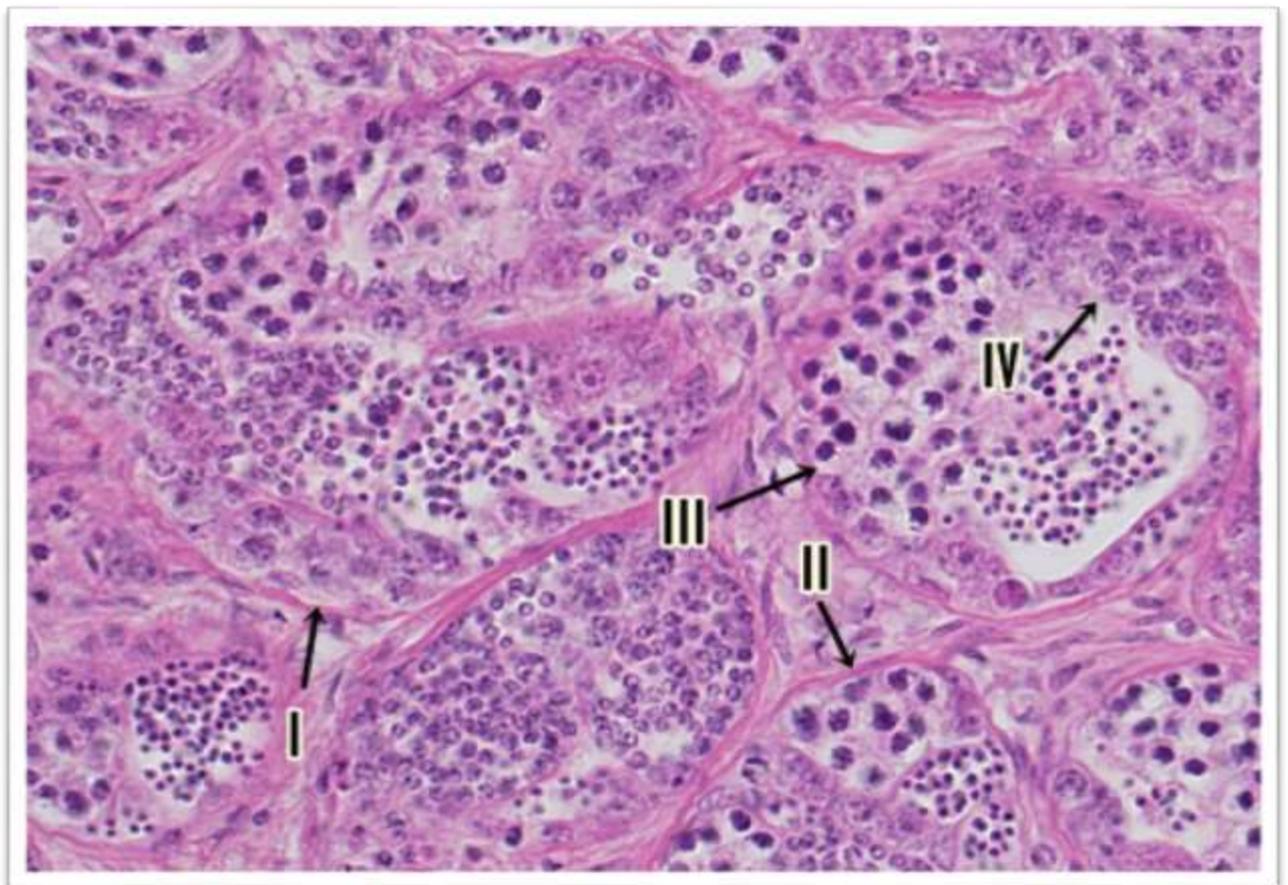
As divisões mitóticas das espermatogônias A, originam as espermatogônias B, ou secundárias. Os cortes histológicos de tuviras induzidas e do grupo controle não apresentaram diferenças significativas quanto a quantidade de espermatogônias B (Tabela 01).

Na maturação intermediária, as quantidades de espermatogônias B aumentam enquanto as quantidades de espermatogônias A diminuem. Gônadas que alcançam a maturação final, apresentam menores quantidades de espermatogônias primárias e secundárias (FRANÇA, 2010a, 2010b). Os resultados encontrados por França (2010a, 2010b) não corroboram para encontrado na presente pesquisa, se fazendo necessário mais estudos quanto a este tipo celular.

Em todos os tratamentos foram observados espermatogônias B em diversas fases da divisão mitótica. Schulz et al. (2002) e Lacerda et al. (2006), mencionam em seus estudos que as espermatogônias secundárias sofrem várias divisões mitóticas, originando gerações de espermatogônias B (Figura 11).

A quantidade de divisões mitóticas das espermatogônias secundárias em tuviras, ainda não foi relatada até a data da presente pesquisa. Estudo em alguns peixes já são mencionados, como nos peixes mosquito (*Gambusia affinis*), em que foram observadas de dez a doze divisões mitóticas e na truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em que foram observadas seis divisões das espermatogônias B (GEISER, 1994 apud SCHULZ, 2010; LOIR, 1999).

Figura 11: Corte histológico do testículo de tuvira do grupo controle indicando cistos de quatro gerações de espermatogônias secundárias em ordem crescente de divisão (I, II, III e IV).



Arquivo pessoal.

Foi observado nos cortes histológicos dos testículos de todos os tratamentos espermatogônias B menores, quando comparadas as espermatogônias primárias, de

núcleo grande e delimitação citoplasmática pouco evidente, corroborando com Vergílio (2012), Moreira (2010) e França (2010a, 2010b) (Figuras 10 e 11).

### 5.2.3 Espermatócitos primários

A divisão meiótica das espermatogônias B, até a fase de meiose I, originarão os espermatócitos primários, dando início a fase espermatocitária ou meiótica. Para estas células, os tratamentos induzidos com os hormônios eCG e o GnRH-a apresentaram diferenças significativas do tratamento controle e dos peixes induzidos com EBHC ( $P < 0,05$ ).

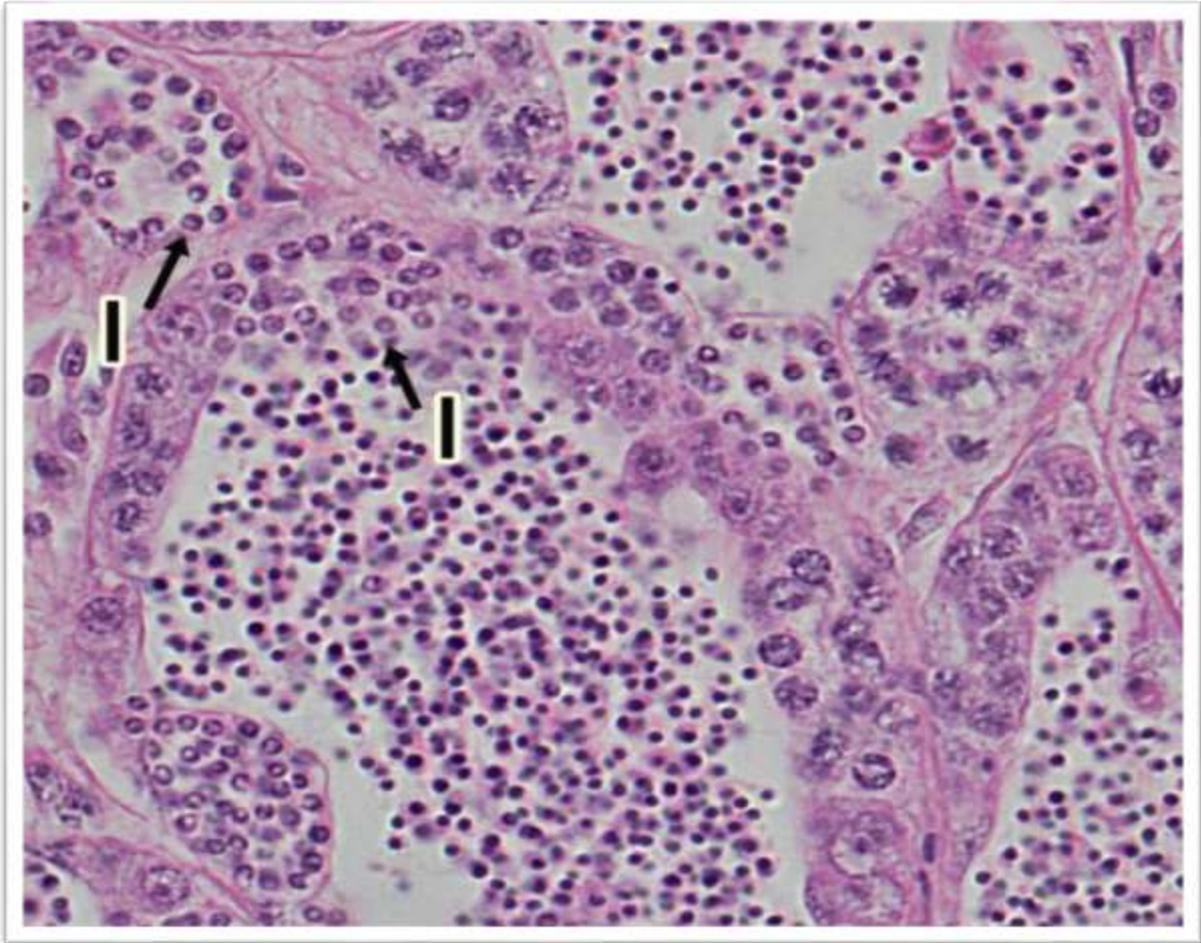
Os peixes induzidos com eCG e GnRH-a, apresentaram as médias menores e não apresentaram diferenças significativas entre si. O EBHC, assim como o grupo controle não se diferiram entre si e apresentaram as médias maiores (Tabela 01).

Níveis de espermatócitos primários menores que o grupo controle, nos tratamentos hormonais com eCG e GnRH-a, sugerem um estágio de maturação gonadal maior para estes testículos.

Estes níveis menores se justificariam pela diferenciação destes espermatócitos primários em secundários e conseqüentemente em espermátides. França (2010a), ao classificar as fases reprodutivas de machos *Gymnotus* sp., caracterizou as fases de maturação final como uma fase de menor quantidade de espermatócitos primários e secundários.

Nas imagens dos cortes histológicos, observou-se que os espermatócitos primários encontraram-se agrupados formando cistos, com formato regular, citoplasma hialino e escasso, quase totalmente ocupado por um núcleo central e esférico. Apresentaram diâmetro celular bem menor que as espermatogônias B (Figura 12). Não foram encontradas diferenças morfométricas destas células quando comparadas a outros estudos (VERGÍLIO, 2012; MOREIRA, 2010; FRANÇA, 2010a, 2010b; COGNATO, 2005; COGNATO 2006).

Figura 12: Corte histológico do testículo de tuvíra induzida com o hormônio GnRH indicando dois cistos de espermatócitos primários (I).



Arquivo pessoal

#### 5.2.4 Espermatócitos secundários

Os espermatócitos secundários se formam a partir da meiose II dos espermatócitos primários. Os cistos de espermatócitos secundários apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) do grupo controle para os tratamentos com os hormônios eCG e EBHC, apresentando a menor e maior média respectivamente (Tabela 01).

Os animais induzidos com hormônio GnRH-a não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) do grupo controle e dos peixes induzidos com o hormônio eCG.

A maior média significativa de espermatócitos secundários para o hormônio EBHC sugere uma maturação gonadal bem inferior aos demais hormônios, visto que os espermatócitos secundários não chegaram a fase de espermátides (Tabela 01).

Sugere-se que este hormônio exige um período de ação maior que os demais hormônios utilizados na pesquisa.

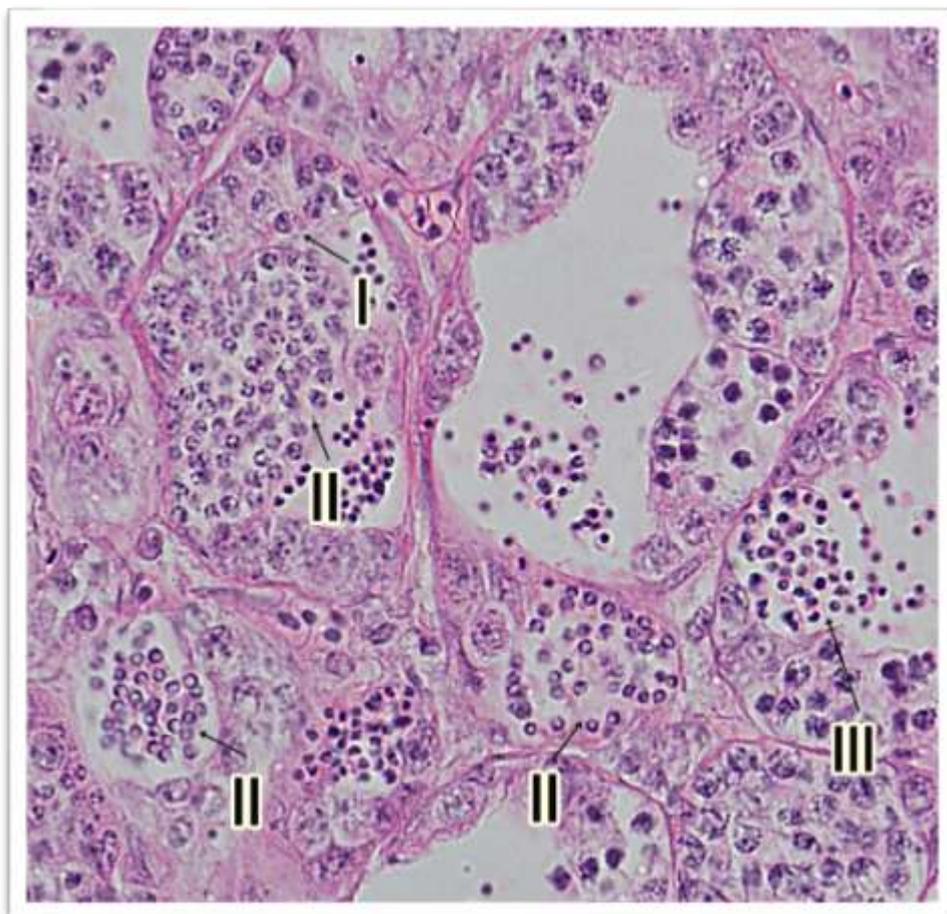
O tratamento utilizando o hormônio eCG, apresentou média significativamente menor quando comparado ao grupo controle, caracterizando a fase de maturação final dos testículos. Os tratamentos com eCG e GnRH-a não se diferiram entre si de forma significativa.

Testículos induzidos com GnRH-a não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle e ao hormônio eCG. Porém pode-se sugerir que este tratamento também se encontra em fase de maturação final, quando considerado os valores apresentados para espermatogônias A e espermátides (discutidas adiante).

Estes resultados corroboram para alguns estudos sobre a maturação gonadal em tuviras, em que determinam as fases de maturação inicial com maior quantidade de espermatócitos secundários, quando comparado a fase de maturação final (VERGÍLIO,2012; MOREIRA, 2010; FRANÇA, 2010a).

Os referidos estudos também observaram para os espermatócitos secundários, células sutilmente menores que os espermatócitos primários, se apresentando como cistos regulares na parede tubular. Os mesmos resultados foram encontrados em cortes histológicos de todos os tratamentos (Figura 13).

Figura 13: Corte histológico do testículo de tuvira induzida com o hormônio EBHC indicando um cisto de espermatócito primário (I), dois cistos de espermatócitos secundários (II) e um cisto de espermatíde (III).



Arquivo pessoal.

### 5.2.5 Espermatídes

A partir meiose II dos espermatócitos secundários, surge os cistos de espermatídes. Para estes cistos os animais induzidos com os hormônios GnRH-a e eCG apresentaram valores diferentes significativamente do grupo controle e entre si ( $P < 0,05$ ), detendo as maiores médias, respectivamente.

O tratamento com EBHC, apresentaram testículos com as menores médias para espermatídes, não apresentaram diferença significativa do grupo controle, mas se diferenciaram significamente dos demais hormônios (eCG e GnRH-a) ( $P > 0,05$ ).

As espermatídes são células a sofrer diferenciação se tornando espermatozoides. Sua presença em grandes quantidades indicam a fase de maturação final dos testículos.

A presença de maior média destas células para as tuviras induzidas com GnRH, indicam a maior eficiência deste hormônio na indução dos peixes a reprodução.

Uma possível explicação para a maior espermiogênese do hormônio GnRH-a, seria a ação do LH e do FSH endógenos do peixe. Os receptores de membrana das células de Sertoli e Leydig se ligariam a estas moléculas naturais, gerando uma resposta melhor na indução dos peixes.

Para o tratamento com EBHC, as médias foram menores em relação aos demais tratamentos e sem diferença significativa para o grupo controle. Esta média sugere peixes em maturação inicial das gônadas quando associada a alta presença de espermátócitos secundários. A eficiência reprodutiva deste hormônio quanto ao período de ação sugere um tempo maior.

O hormônio eCG, representou a segunda maior média para a quantidade de espermatídes, propondo uma segunda maior eficiência na indução de tuviras.

Para os resultados obtidos com os hormônios eCG e EBHC, uma provável explicação seria a menor capacidade destes se ligar nos receptores de membrana das células de Sertoli e Leydig, visto que são hormônios originários de espécies diferentes, sendo o primeiro derivado de equinos e o segundo de carpas.

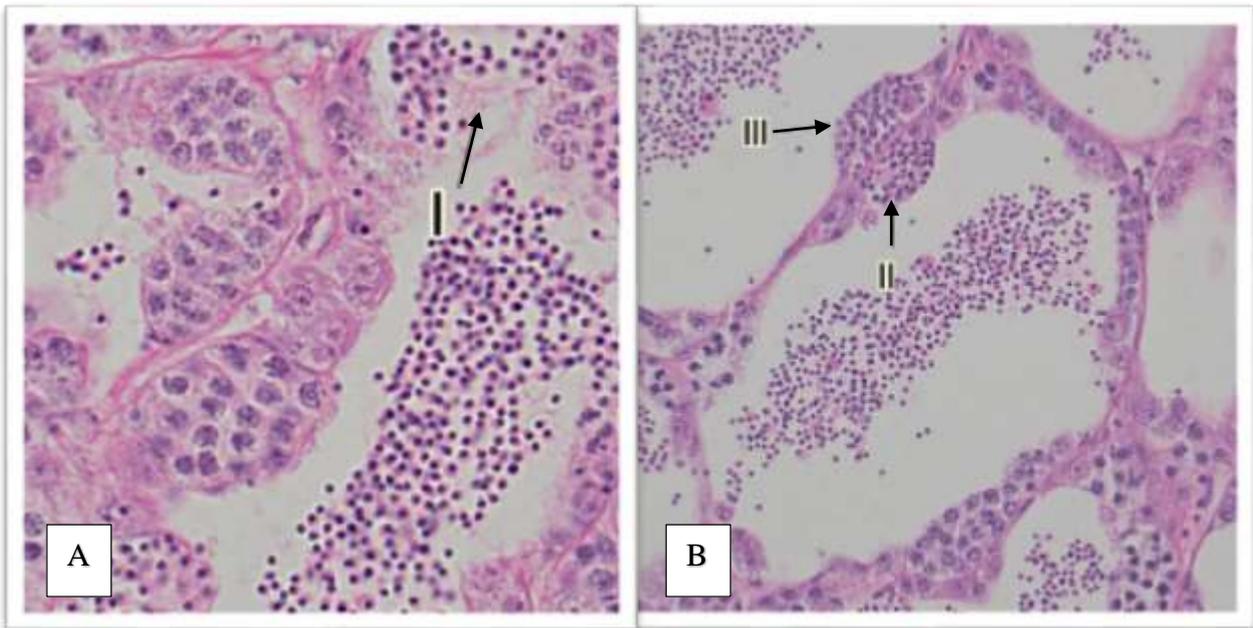
Meistrich et al, 2005, relata a importância dos receptores de membrana na ação hormonal. O autor menciona que a especificidade destes receptores é complexa e variável de acordo com a espécie.

As espermatídes se apresentaram como células menores que os espermátócitos secundários e mais abundantes nos cistos germinativos. Apresentam pouca cromatina e estão situadas próximo ao lúmen do túbulo seminífero.

Cistos de espermatídes foram encontrados íntegros e rompidos. Em cistos rompidos as espermatídes foram encontradas no lúmen tubular, caracterizando a espermatogênese semi-cística (Figura 14).

Vergílio (2012), Moreira (2010) e França (2010a), mencionam, para tuviras, a presença de um maior número de cistos de espermatídes no estágio de maturação final. Os autores mencionados observaram as mesmas estruturas celulares e císticas, colaborando para os resultados encontrados, especialmente para espermatogênese semi-cística.

Figura 14: Corte histológico do testículo de tuvíra induzida com os hormônios eCG (A) e EBHC (B) indicando um cisto de espermatídes rompido (I), um cisto de espermatíde íntegro (II) e um cisto de espermatócitos secundários.



Arquivo pessoal

### 5.2.6 Células de Sertoli

As células de Sertoli, que determinam a capacidade espermatogênica do testículo, estão envolvidas na nutrição, sustentação, fagocitose e estimulação das células germinativas. Todos os tratamentos com hormônios, exceto o EBHC, apresentaram diferenças significativas para o grupo controle, que apresentou maior média (Tabela 01).

O hormônio EBHC, por sua vez não apresentou diferença significativa para os demais indutores (eCG e GnRH).

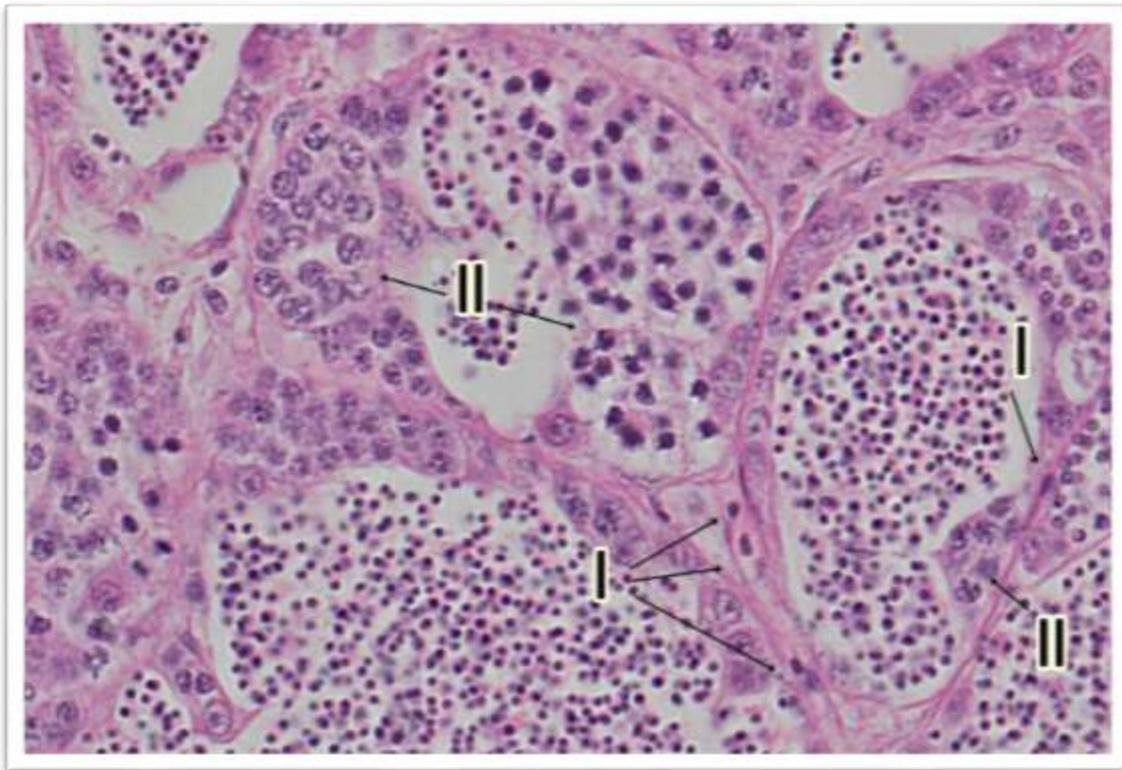
A quantidade de células de Sertoli pode ser associada ao número de espermatogônias A e B, principalmente. Para todos os tratamentos a maior quantidade de espermatogônias A e B, acarretou um aumento na presença de células de Sertoli (Tabela 01).

Em mamíferos, as células de Sertoli são constantes, não havendo aumento em seu número durante a espermatogênese. Para peixes há relatos do aumento do número de células de Sertoli de acordo com as divisões mitóticas ou espermatogoniais. A intensidade deste aumento nas células de Sertoli, são espécie-

específicos e de acordo com a fase reprodutiva dos peixes (SCHULZ et al., 2010; Billard, 1969 apud SCHULZ et al. 2010; MATTA et al., 2002).

As células de Sertoli foram encontradas na periferia dos túbulos com núcleo evidente e centralizado, citoplasma bem delimitado e formato triangular, apresentando-se de forma isolada (Figura 15). Schulz et al (2010) e Grier (1993), descreveram as mesmas características morfométricas para estas células.

*Figura 15: Corte histológico do testículo de tucuna induzida com os hormônios GnRH indicando células de Sertoli (I) e cistos de espermatogônias B (II)*



Arquivo pessoal

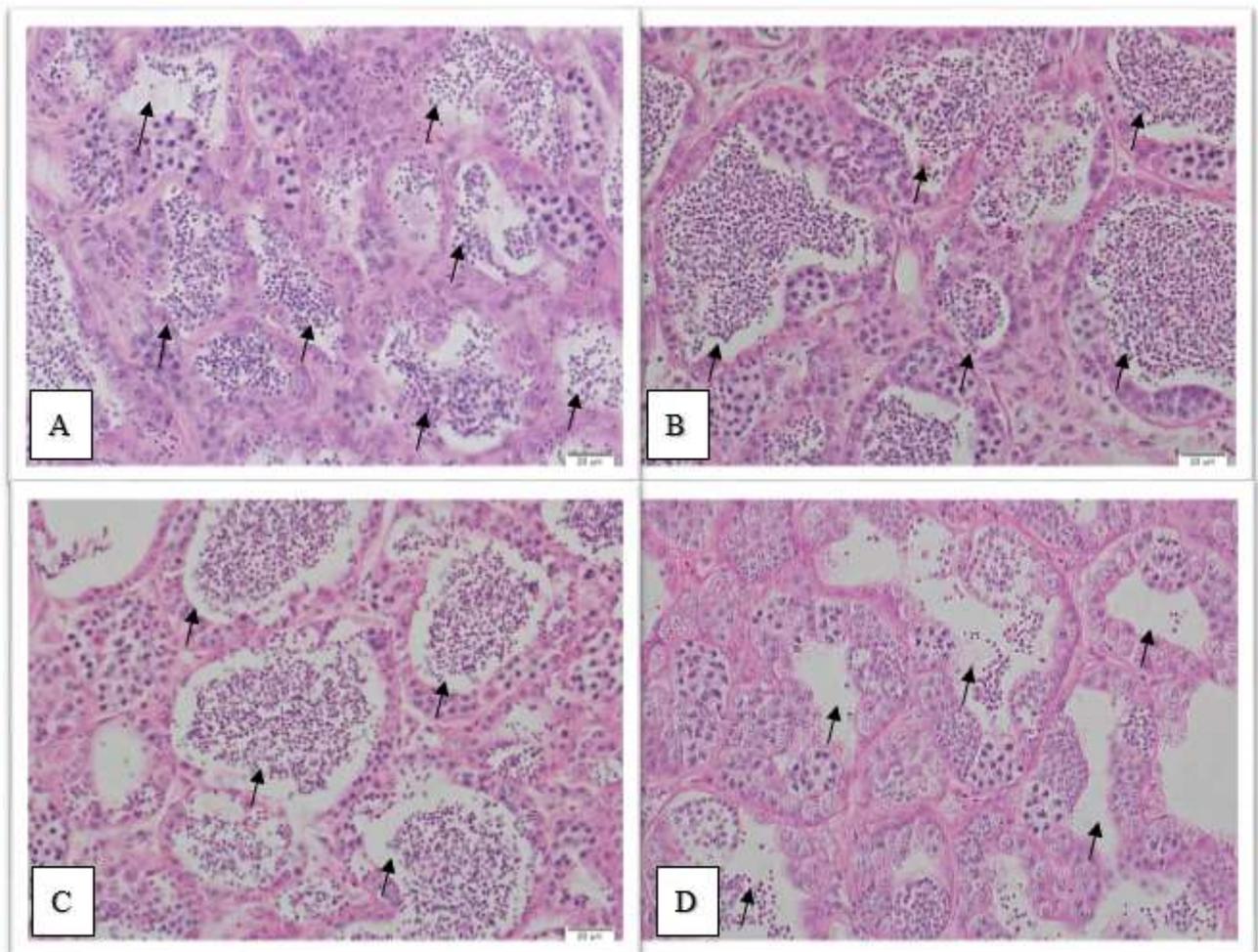
### 5.2.7 Lúmen

No lúmen testicular, se localizam os espermatozoides. Em peixes, ao contrário dos mamíferos, os espermatozoides sofrem sua maturação na luz dos túbulos ou lúmen tubular. Não houve diferenças significativas para nenhum tratamento sobre as médias referentes ao lúmen tubular, porém foi observado diferenças na quantidade de espermatozoides dentro do lúmen.

Os hormônios GnRH-a e eCG apresentaram lúmens mais repletos, o tratamento com o hormônio EBHC e o grupo controle apresentaram lúmens com poucas concentrações espermáticas (Figura 16).

Tais resultados pontuam novamente para a maturação incompleta dos testículos induzidos com EBHC e a melhor eficiência hormonal dos hormônios GnRH-a e o eCG. A maior quantidade de espermatozoides no lúmen testicular de peixes em estágio de maturação final, foi observada por Vergílio et al. (2012), Schulz et al.(2010) e França (2010a).

Figura 16: Corte histológico do testículo de tuviras mostrando o lúmen tubular com espermatozoides (setas). A figura A representa o grupo controle, a figura B representa o grupo induzido com o hormônio GnRH, a figura C representa os animais induzidos com o hormônio.



*Arquivo pessoal*

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com as análises efetuadas, conclui-se que o análogo sintético do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH-a) apresentou os melhores resultados na indução hormonal de tuias, *Gymnotus* spp.

A gonadotrofina coriônica equina (eCG) apresentou o segundo melhor resultado na maturação final dos testículos dos peixes.

O extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), não conseguiu induzir os testículos a maturação final até o momento da eutanásia, sugerindo um tempo maior de ação.

Maiores pesquisas se faz necessário, na criação de tuias em cativeiro visando o conhecimento, a criação e a preservação da espécie.

## 7 REFERÊNCIAS

- AMANO M., IIGO M., IKUTA, K., KITAMURA, S., YAMADA, H., YAMAMORI, K. *Roles of Melatonin in Gonadal Maturation of Underyearling Precocious Male Masu Salmon*. *General and Comparative Endocrinology* , p.190-197, 2000.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. New York. Garland Science, ed. 4, 2002.
- ANDRADE, D. R.; YASUI; G. S.; *O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n. 2, p.166-172, abr/jun, 2003.
- ANDRADE, E. S.; *Protocolos de indução hormonal em lambari (Astyanax fasciatus), e curimba (Prochilodus lineatus)*. UFLA, 2012. 89 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias: Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- ANDRADE-TALMELLI, E. F.; KAVAMOTO, E. T.; NARAHARA, M. Y.; VERANI, N. F. *Reprodução induzida da piabanha, Brycon insignis (Steindachner, 1876), mantida em cativeiro*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.31, n.2, p.803-811, 2002.
- BALDISSEROTTO, B. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. 3.ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 350p., 2013.
- BATLOUNI, S.R.; CARRENO, F.R.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M.I. *Cell junctions in the germinal epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish P. fasciatus (Pisces, Siluriformes)*. *Journal of molecular histology*, v.36, p. 97-110, feb, 2005.
- BERNARDINNO G, FERRARI VA. *Indução para ovulação de tambaqui Colossoma macropomum, usando dois análogos de LHRH-a*. Síntese dos trabalhos realizados com espécie do gênero *Colossoma Pirassununga*, SP: CEPTA, 1987.
- BILLARD R.; FOSTIER A.; WEIL C.; BRETON B. *Endocrine Control of Spermatogenesis* In: *Teleost Fish*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. P. 65–79. 1982.
- BORELLA, M.I.; CHEHADE, C.; COSTA, F. G.; BATLOUNI, S. R. *Gametogênese e o Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas*. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINAT, E. C. *Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce*. Jaboticabal, SP, Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Educação - FUNEP, p. 285-305, 2014.
- BROMAGE, N., PORTER, M., RANDALL, C. *The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin*. *Aquaculture*,v.197, n. 1-4, p. 63-98, 2001.

CARVALHO, A. R. MEDEIROS, E. R.; *Levantamento socioeconômico e da composição de espécies entre os turistas que praticam a pesca recreativa no Rio Araguaia, região de Aruanã (GO)*. Revista Saúde e Ambiente/ Health and Environment Journal, Santa Catarina, vol. 6, n. 2, p. 23-31, 2005.

CASCIOTTA, J.; ALMIRO'N, A.; AS'NCHEZ, S.; IWASZKIW, J.; BRUNO, M.C. *The genus Gymnotus (Gymnotiformes: Gymnotidae) in Argentina. How bad taxonomy results in poor regulations and no conservation*. Journal of Applied Ichthyology, Berlin, v.29, p. 208–212, 2012.

COGNATO, D. P.; FIALHO C. B.; *Reproductive biology of a population of Gymnotus aff. carapo (Teleostei: Gymnotidae) from southern Brazil* ). Neotropical Ichthyology, Sociedade Brasileira de Ictiologia, Porto Alegre, p. 339-348, 2006.

COGNATO, D. P. *Biologia Reprodutiva de Gymnotus aff. Carapo Linnaeus, 1758 (Teleostei: Gymnotidae) do Parque estadual de Itapuã*. UFRGS, 2005. 73 f. Dissertações (Mestrado)-Programa de Pós Graduação em Biologia Animal: Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

COSTA, R. B.; SALES, R. O.; MAGGIONI, R.; VIDAL, D. L.; FARIAS, J. O. *Possibilidades da exploração comercial de peixes reofílicos em cativeiro: Uma Revisão*. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 06, n. 2, p. 92-114, jul/dez, 2012.

COWARD, K.; BROMAGE, N. R.; HIBBITTL, O.; PARRINGTON, J. *Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, v.12, p. 33-58, 2003.

CUETO, J., A., M. *Cerebro y Reproducción en Peces: Bases Neurales y Neuroendocrinas*. In: ESTÉVEZ, M., A., C. *La Reproducción de Los Peces: Aspectos Básicos y Sus Aplicaciones en Acuicultura*. Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura, 2009, p.27.

CURRY, M. X., TSUKAMOTO, R. Y. *A utilização de LHRH-a (Gonadorrelina) na reprodução induzida do pacu, Colossoma mitrei em condições de campo*. In: POLI, C. R., SOUZA, D. O., PICCININ, I. S., NASCIMENTO, P. A. M, RODRIGUES, J. B. R. (Ed.). *Memórias do Simpósio Latinoamericano de Acuicultura*, v. 6, p.174, Florianópolis, SC. 1988.

EKSTRÖM, P.; MEISSI, H. *The pineal organ of teleost fishes*. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 199-284, 1997.

FÁLCON J, MIGAUD H, MUÑOS-CUETO JAE, CARRILLO M. *Current knowledge on the melatonin system in teleost fish*. General and Comparative Endocrinology, v.165, p.469-482, 2010.

FALCON, J., BESSEAU, L., SAUZET, S., BOEUF, G. *Melatonin effects on the hypothalamopituitary axis in fish*. Trends in Endocrinology and Metabolism, v.18, n.2, 81-88, 2007.

FRANÇA, F. G. *Caracterização do epitélio germinativo das fêmeas e machos de *Gymnotus sp.*, e perfil hormonal durante o ciclo reprodutivo (Teleostei, Ostariophysi, Gymnotiformes)*. UNICAMP, 2010. 148 f. Teses (Doutorado)-Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010a.

FRANÇA, F. G; GRIER, J. H.; GRASSIOTTO, Q. *A new vision of the origin and the oocyte development in the ostariophysi applied to *Gymnotus sylvius* (Teleostei, Gymnotiformes)*. Neotropical Ichthyology, Sociedade Brasileira de Ictiologia, Porto Alegre, p. 787-804, 2010b.

GARCÍA-LÓPEZ, Á., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G., SARASQUETE, C. *Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): anatomy, histology and histochemistry*. Histopathology. V.20, p.1179-1189, 2005.

GRASSIOTTO, Q.; ISHIBA, D. D. W. *Gametogênese de Peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo*. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.37, p.181-191, abr/jun, 2013.

GRIER, H. J.; URIBE-ARANZÁBAL, M. C. The testis and spermatogenesis in teleosts. In: JAMIESON, B. G. M. *Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony fishes)*. New Hampshire. Science Publishers, pp.119-42. 2009.

GRIER HJ. The germinal epithelium: Its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: CRESWELL RL (Ed.). *Proceedings of the Fifty-third Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 2000, Biloxi, Mississippi. Fort Pierce, FL: Gulf and Caribbean Fisheries Institute, p.537-552, 2002.

GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. *The Sertoli cell*. London. Elsevier Academic Press. 1993.

GRIER, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. – *American Zoologist* 21 (2): 345–357, 1981.

HARVEY B, CAROLSFELD J. *Induced breeding in tropical fish culture*. Ottawa: IDRC, p.144, 1993.

KUBITZA, F. *Reprodução, Larvicultura e Produção de Alevinos de peixes Nativos*. Coleção Psicultura Avançada. Jundiaí, 71p, 2004.

KITAHASHI, T.; SHAHJAHAN, M.; ISHWAR, S. Hypothalamic Regulation of Pituitary Gonadotropins. In: SENTHILKUMARAN, B. *Sexual Plasticity and Gametogenesis in Fishes*. Malaysia, Nova Science Publishers, v.1, p. 153-181, 2013.

KOULISH S, KRAMER CR, GRIER HJ. 2002. *Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae)*. J Morphol. 254:292, 2002.

LETHIMONIER, C.; MANDIGOU, T.; MUÑOZ CUETO, J. A.; LAREYRE, J.J.; KAH, O.; *Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish*. General and comparative endocrinology. P.1-16, Jan. 2004.

LEVAVI-SIVAN, B. et al. *Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (Bidyanus bidyanus)*. Aquaculture, v.229, p.419-431, 2004.

LOIR, M. *Spermatogonia of rainbow trout: II. In vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity*. Molecular Reproduction and Development, v.53, p.434-442. 1999.

MATTA, S.L.; VILELA, D.A.; GODINHO, H.P.; FRANÇA, L.R. *The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (Oreochromis niloticus) model*. Endocrinology, v.143, 970-978. 2002.

MÉNDEZ, A., RODRIGUEZ J. A. *Reproducción inducida en cachama (Piaractus brachypomus Cuvier) con busserelina (Conceptal)*. Siall, v.6, p.7-11, 1989.

MENIN, E. *Anatomia funcional do tubo digestivo de Gymnotus carapo Linnaeus, 1758 (Siluriformes, Gymnotoidei, Gymnotidae)*. Revista Ceres, v.36, n.207, p.435-457, 1989.

MINAS GERAIS. Companhia Energética de Minas Gerais – CEMIG, FUNDAÇÃO Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC. *Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande*. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 144 p., 2000.

MIURA T, MIURA CI. *Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis*. Fish Physiology Biochemistry 28:181-186, 2003.

MIURA T., OHTA T., MIURA C.I., YAMAUCHI K. *Complementary deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor*. Endocrinology, v.144, p.5504-5510, 2003.

MORAES, A. S.; ESPINOZA, L. W. *Captura e comercialização de iscas vivas em Corumbá, MS. Corumbá*. Embrapa Pantanal. Boletim de Pesquisa 21, Corumbá, 37p, 2001.

MOREIRA, V. Renata. *Efeitos Anatomopatológicos após Contaminação in Vitro por Cloretos de Mercúrio e de Cádmio em Testículos do Peixe Teleósteo Gymnotus carapo (tuvira) (linnaeus, 1758)*. Brasil. 2010. 13 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós Graduação em Biociências: Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense. 2010.

NWADUKWE F. O. *Inducing oocyte maturation, ovulation and spawning in the African catfish, Hetrobranchus longifilis Valenciennes (Pisces: Claridae), using frog pituitary extract*. Aquaculture Fish Man, v.24, p.625-630, 1993.

NAGAHAMA, Yoshitaka. The Functional Morphology of Teleost Gonads. In: Hoar W. S.; Randall D. J.; Donaldson E. M. *Fish Physiology*. Flórida. Academic Press, INC., 227 p., 1983.

NAVARRO, F.,K.,S.,P.; NAVARRO, R.,D. *Importância do fotoperíodo no crescimento e na reprodução de peixes*. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.36, n.2, p.94-99, abr./jun.2012.

NAVARRO, F.,K.,S.,P. *Efeito do fotoperíodo na atividade locomotora e parâmetros fisiológicos em fêmeas de lambari (Astyanax bimaculatus)*.UFLA, 2010. 59 f., Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias: Ciências Veterinárias, Lavras, Minas Gerais, 2010.

PADUA, D. M. C. *Fundamentos de Piscicultura*. 2. ed. Goiânia: UCG, p. 341 p., 2001.

PEREIRA, G. J. M.; *utilização de gonadotropina coriônica eqüína e/ou extrato bruto de hipófise de carpa na indução da reprodução de curimba (Prochilodus lineatus)*.UFLA, 2006. 61 p., Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Ciências Veterinárias : Ciências Veterinárias, Lavras, Minas Gerais, 2006.

PILLAY, T. V. R. *Aquaculture – Principles and practices*. Fishing News Books, Cambridge, England, 1995.

RAMOS, R. O., RAMOS, S. M., MENDONÇA J. O. J. *Utilização de análogos do LHRH na indução do matrinchá, Brycon cephalus*. Boletim Técnico CEPTA, v.10, p.1-7, 1997.

RATTY, F. J; LAURS, R. M; KELLY R. M; *Gonad Morphology, Histology, and Spermatogenesis in South Pacific Albacore Tuna Thunnus alalunga (Scombridae)*. *Fishery Bulletin*. 1990.

ROTTA, M. A.; *Aspectos Biológicos e Reprodutivos para a Criação da Tuvira (Gymnotus sp.) em Cativeiro – I*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 73/ Embrapa Pantanal, Corumbá, p. 1-16, 2004.

ROTTA, M. A.; *Determinação do sexo da tuvira Gymnotus sp. através da análise de imagem de ultra-som [recurso eletrônico]* / Marco Aurélio Rotta, Merlison Figueiredo Pedroso, Luiz Carlos Acorci – Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2007.

RESENDE, E. K.; CÂNDIDO R. A. P.; SÓRIO V. F.; GALVÃO E. M.; *Biologia da Tuvira, Gymnotus cf. carapo no Baixo Rio Negro, Pantanal, Mato Grosso do Sul*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 67/ Embrapa Pantanal, Corumbá, v.28, 42 p.,2006.

SHERWOOD, N. M.; LOVEJOI, D. A.; COE, I. R. Origin of nonmammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocrine Reviews*, v.14, 241-254, Apr.1993.

SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J. J.; LEGAC, F.; GARCIA, H. C.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. *Spermatogenesis in fish*. *General and Comparative Endocrinology*, v.165, p. 390-411, 2010.

SCHULZ, R.; MIURA T. *Spermatogenesis and its endocrine regulation*. Fish Physiology and Biochemistry. Netherlands. Kluwer Academic Publishers, v.26, p. 43-56, 2002.

STREIT Jr. D. P. *Extrato de hipófise de frango e de coelho como indutores gonadais de pacu (Piaractus mesopotamicus) macho e fêmea, em comparação com o extrato de hipófise de carpa*. 2002. UEM, 2002. 36f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado em Zootecnia: Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá 36f., Maringá, 2002.

SZABÓ, T.; MEDGUASSZAY, C.; HORVÁTH, L. *Ovulation induction in nase (Chondrostoma nasus, Cyprinidae) using pituitary extract or GnRH analogue combined with domperidone*. Aquaculture, v.203, p.389-395, 2002.

TRUDEAU, V. L. *Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, Carassius auratus*. Reviews of Reproduction, v. 2, 55-68, 1997.

VAZZOLER, A. E. M. A. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EDUEM, 1996.

VERGÍLO C. S.; MOREIRA R. V.; CARVALHO C. E.V.; MELO E.J.T. *Characterization of mature testis and sperm morphology of Gymnotus carapo (Gymnotidae, Teleostei) from the southeast of Brazil*. Acta Zoologica, p.01-07, 2012.

WEN, H.S.; LIN, H.R. *Effects of exogenous neurohormone, gonadotropin (GtH) and dopaminergic drugs on the serum GtH content and ovulatory responsiveness of wild catfish, Silurus asotus (Linnaeus, 1758)*. Aquaculture Research. v.35, p.204-212, 2004.

YARON, Z., GUR, G., MELAMED, P., ROSENFELD, H., ELIZUR, A., LEVAVI-SIVAN, B. *Regulation of fish gonadotropins*. International Review of Cytology, v. 225: 131-185, 2003.

ZANIBONI, E.; WEINGARTNER, M. *Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores*. Revista Brasileira de Reprodução Animal. Belo Horizonte, p.367-373, jul./set. 2007.

ZANIBONI-FILHO E, BARBOSA NDC. *Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish*. Revista Brasileira de Biologia, v.56, p.655-659, 1996.

ZOHAR, Y.; MYLONAS, C.C. *Endocrinemanipulations of spawning in cultured fish:from hormones to genes*. Aquaculture, v.197, p.99-136, 2001.