



ELIANE APARECIDA DE ANDRADE

**PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, PERFIL
HORMONAL E MORFOMETRIA DE CURIMBA
(*Prochilodus lineatus*)**

LAVRAS - MG

2016

ELIANE APARECIDA DE ANDRADE

**PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, PERFIL HORMONAL E
MORFOMETRIA DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr Luis David Solis Murgas

LAVRAS - MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Andrade, Eliane Aparecida de.

Parâmetros hematológicos, perfil hormonal e morfometria de curimba (*Prochilodus lineatus*) / Eliane Aparecida de Andrade. –
Lavras : UFLA, 2016.

105 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Curimba. 2. Perfil hormonal. 3. Reprodução. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

ELIANE APARECIDA DE ANDRADE

**PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, PERFIL HORMONAL E
MORFOMETRIA DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 18 de dezembro de 2015.

Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado	UFG/IB
Dra. Viviane de Oliveira Felizardo	UFLA
Dra. Daniella Aparecida de Jesus Paula	IFET/Rio Pomba
Dra. Estefânia de Sousa Andrade	UFLA

Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

LAVRAS – MG

2015

Dedico ao meu filho Davi Andrade

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido durante o doutorado.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Medicina Veterinária por oferecer todo o suporte necessário.

À minha família, principalmente à minha irmã Kenia e seu marido Marcelo, pelo apoio em um dos momentos mais difíceis da minha caminhada.

Aos meus sobrinhos, Eduardo, Felipe, Hebertty, Pâmela, Grazielly e Julya, que me fazem acreditar que em uma família sempre há esperança.

Ao professor e orientador, Dr Luis David Solis Murgas, especial agradecimento,

pela oportunidade e carinho durante este período. Sem sua generosidade não seria possível chegar até aqui. Você será sempre um exemplo profissional e pessoal.

Ao Professor Dr Márcio Gilberto Zangeronimo pela impecável condução da coordenação do programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias.

Ao Sr. Gilson e Jailson da estação de piscicultura de Itutinga/MG e demais funcionários muito obrigada por permitir a realização das coletas e pela paciência na hora da coleta de sangue dos peixes.

À Isadora Assis pela paciência. Sem você não teria análise hematológica. Muito obrigada.

À Daniella pelo apoio e discrição.

À professora Dra. Ana Paula Peconick pelas brilhantes aulas e grandes dicas, meu carinho e respeito.

Aos colegas de laboratório, Isadora Marques, Isadora Assis, Jonathan, Tássia muito obrigada pelo carinho, auxílio e pelos prazerosos intervalos de almoço.

Ao Willian e Fidelis pela ajuda e dedicação na organização dos experimentos.

A todas as pessoas que não foram citadas, mas de alguma forma me auxiliaram profissional e pessoalmente, muito obrigada.

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.*

(Chico Xavier)

RESUMO GERAL

Os peixes de piracema constituem parte significativa da piscicultura nacional. A indução da reprodução com aplicação de hormônios que induzem à maturação final e à liberação dos gametas constitui-se uma técnica eficiente, permitindo que os mesmos completem seu ciclo reprodutivo e em condições controladas. **No primeiro artigo** objetivou-se estudar a influência do perfil hormonal sobre o padrão hematológico de curimba (*Prochilodus lineatus*) frente a condições de estresse de manejo durante o período reprodutivo. O experimento foi conduzido na estação de piscicultura da CEMIG de Itutinga/MG durante período reprodutivo. Foram analisados os parâmetros eritrocitários e leucocitário e comparados com dosagem dos hormônios gonadais, cortisol e a glicemia de machos e fêmeas de curimba. Houve diferenças estatísticas nas concentrações de glicose de machos e fêmeas e testosterona em machos ($p < 0,10$). Entre os machos, os parâmetros hematológicos não apresentaram diferenças estatísticas para o perfil eritrocitário. O valor relativo de linfócitos, neutrófilos e monócitos oscilou mostrando diferença estatística entre eles ($p < 0,10$). As concentrações dos hormônios e os parâmetros hematológicos das fêmeas não apresentaram diferenças estatísticas, exceto para os monócitos ($p > 0,10$). Conclui-se que, durante o período reprodutivo, alterações no perfil hematológico de curimba (*Prochilodus lineatus*) podem ocorrer, possivelmente, devido ao estresse ocasionado pelas modificações ambientais e fisiológicas das condições de manejo. **No segundo artigo**, o objetivo foi determinar os parâmetros reprodutivos utilizados durante a seleção de reprodutores para indução hormonal e correlacioná-los com o perfil hormonal em machos e fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*) induzidos com EBHC. Após a seleção, os reprodutores foram pesados e medidos sendo aM1 feita na posição das nadadeiras peitorais, M2 entre as nadadeira e papila urogenital e M3 na posição da papila urogenital. Quantificou-se a glicose, testosterona, 17- β -estradiol, progesterona e o cortisol. A testosterona não apresentou correlação com o abaulamento celomático ou com a qualidade dos gametas ($p > 0,10$). Para fêmeas não houve diferença estatística na concentração plasmática de estradiol e progesterona e nenhuma correlação entre os hormônios com os parâmetros de qualidade de desova. A glicose plasmática apresentou uma correlação positiva com abaulamento ventral. Conclui-se que os parâmetros morfométricos não são confiáveis para avaliação da maturação gonadal em machos e fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*).

Palavras-chave: Hormônios. Reprodução. Morfometria.

GENERAL ABSTRACT

Migratory fish have significant importance in fish farming in Brazil. Hormone-induced fish spawning is a technique that induces final maturation and gamete release, allowing the fish to complete the reproductive cycle under controlled conditions. In the first article, the objective was to study the influence of the hormonal status over the blood pattern of curimba (*Prochilodus lineatus*) against handling stress conditions during the breeding season. The experiment was conducted at the CEMIG fish farming station in Itutinga, Minas Gerais, during breeding season. The erythrocyte and leukocyte parameters were analyzed and compared to the dosing of the gonadal hormones, cortisol and glucose of curimba males and females. There were no statistical differences between concentrations of glucose of males and females, or of testosterone in males ($p>0.10$). Among the males, the hematological parameters were statistically similar to the erythrocyte profile. The relative value of lymphocytes, neutrophils and monocytes varied showing statistical difference between them ($p<0.10$). The concentrations of hormones and the hematological parameters of females did not differ, with the exception of the monocytes ($p>0.10$). In conclusion, during the reproductive period, changes in the hematological profile of curimba (*Prochilodus lineatus*) can occur, possibly due to stress caused by changes in the environment and of physiological management conditions. In the second article, the objective was to determine the reproductive parameters used during the selection of breeding fish for hormonal induction, and correlate them with the hormonal profile of males and females of curimba (*Prochilodus lineatus*) induced with EBHC. After selection, the breeders were weighed and measured. M1 was done in the position of the pectoral fins, M2 was done between the fins and urogenital papilla, and M3 was done in the urogenital papilla position. We quantified glucose, testosterone, 17- β -estradiol, progesterone and cortisol. The testosterone showed no correlation with celomatic bulging or with the quality of gametes ($p>0.10$). For females, there was no statistical difference in the plasma correlation of estradiol and progesterone, as well as no correlation between hormones with spawning quality parameters. Plasma glucose was significantly correlated to ventral bulging. In conclusion, the morphometric parameters are not reliable for evaluating gonadal maturation in males and females of curimba (*Prochilodus lineatus*).

Keywords: Hormones. Reproduction. Morphometric.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 Leucócitos de sangue periférico de fêmea de curimba (*Prochilodus lineatus*). Células obtidas da contagem diferencial em sangue periférico em período reprodutivo. **A** – eritrócitos, **B**- neutrófilo, **C**- monócito, **D**-linfócito, **E**- CGE (coloração Panótipo rápido – Fotomicrografia aumento 1000x).....66
- Quadro 1 Esquema dos dias de coleta realizada durante o período reprodutivo.....51

ARTIGO 2

- Figura 1 Medidas morfométricas de curimba (*Prochilodus lineatus*) durante período reprodutivo. CP-comprimento padrão; CT-comprimento total; M1-medida 1; M2-medida 2; M3-medida 383
- Quadro 1 Esquema dos dias de coleta realizada durante o período reprodutivo.....84

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1	Parâmetros hormonais e glicemia de machos de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) (n=30) avaliados ao longo do período reprodutivo (p<0,10)	58
Tabela 2	Parâmetros eritrocitários de machos de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) (n=30) coletados a longo do período reprodutivo (p<0,10)	59
Tabela 3	Parâmetros leucocitários de machos de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) (n=30) avaliados a longo do período reprodutivo (p<0,10)	60
Tabela 4	Coefficientes de correlação de Sperman estatisticamente significativos entre os parâmetros hormonais e hematológicos de machos de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) durante o período reprodutivo (p<0,10)	60
Tabela 5	Parâmetros hormonais e glicemia de fêmeas de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) (n=30) avaliados a longo do período reprodutivo (p<0,10)	61
Tabela 6	Parâmetros eritrocitários de fêmeas de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) (n=30) avaliados a longo do período reprodutivo (p<0,10)	62
Tabela 7	Parâmetros leucocitários de fêmeas de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) (n=30) coletados a longo do período reprodutivo (p<0,10)	63

Tabela 8	Parâmetros bioquímicos e leucocitários de fêmeas de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) avaliados antes e depois* do estímulo com EBHC (p<0,10).....	64
Tabela 9	Parâmetros bioquímicos e leucocitários de machos de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) avaliados depois do estímulo com EBHC (p<0,10).....	65

ARTIGO 2

Tabela 1	Parâmetros de peso, comprimento padrão e medidas abdominais M1, M2, M3 de machos de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) durante período reprodutivo (p<0,10)	90
Tabela 2	Parâmetros de cortisol, glicose, testosterona, volume de sêmen, concentração espermática e alterações morfológicas (% sptz normais) de machos de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>), coletados durante período reprodutivo (p<0,10).....	91
Tabela 3	Coefficientes de correlação dos parâmetros reprodutivos de machos de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) durante o período reprodutivo (p<0,10)	92
Tabela 4	Parâmetros de peso, comprimento e medidas abdominais de fêmeas de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) durante período reprodutivo (p<0,10)	94
Tabela 5	Parâmetros de glicose, cortisol, progesterona, estradiol, peso desova, número total de oócitos, diâmetro oócitos, PPVG e TF de fêmeas de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) durante período reprodutivo (p<0,10).....	95
Tabela 6	Coefficientes de correlação de Pearson para os parâmetros reprodutivos de fêmeas de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) durante o período reprodutivo (p<0,10).....	96

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

AD	androstenediona
ADH	hormônio antidiurético
AGM	aorta-gônada-mesonefron
AMPc	fosfato de monoadenilatociclase
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
EBHC	extrato bruto de hipófise de carpa
EDTA	ácido etilenodiaminoacético
FSH	hormônio folículo estimulante
GH	hormônio de crescimento
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
GVBD	quebra da vesícula germinativa
Hb	hemoglobina
HCM	hemoglobina corpuscular média
HGE	eosinófilos granulares homogêneos
Hm	hemácia
Ht	hematócrito
Leuco	leucócitos
LH	hormônio luteinizante
Linfo	linfócitos
MALT	tecido linfoide associado à mucosa
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
MIH	hormônio antimulleriano
MIS	esteroide indutor maturação
Mono	monócito

Neutro	neutrófilo
NK	célula Natural Killer
PMN	polimorfonucleares
RNAm	ácido ribonucleico
Sg	sangue
T	testosterona
TSH	hormônio tireotrófico
VCM	volume corpuscular médio

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Características biológicas da curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) (Valenciennes, 1837)	19
2.2	Fatores ambientais que influenciam a biologia de curimba	20
2.3	Parâmetros hematológicos em peixes teleósteos	22
2.4	Células sanguíneas	24
2.4.1	Eritrócitos	24
2.4.2	Leucócitos	25
2.4.3	Linfócitos	25
2.4.4	Monócitos/Macrófagos	27
2.4.5	Granulócitos	28
2.4.6	Trombócitos	29
3	ASPECTOS REPRODUTIVOS EM PEIXES	31
3.1	Hormônios hipofisários e gonadais em fêmeas	31
3.2	Hormônios hipofisários e gonadais em machos	34
	REFERÊNCIAS	37
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	44
	ARTIGO 1 Avaliação dos parâmetros hematológicos em curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) durante período reprodutivo	44
1	INTRODUÇÃO	46
2	MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1	Seleção e indução hormonal de reprodutores	50
2.2	Coleta de sangue	51
2.3	Preparação do esfregaço sanguíneo para contagem diferencial de leucócitos	52
2.4	Índices hematológicos	52
2.4.1	Determinação do hematócrito	52
2.4.2	Contagem de eritrócitos	53
2.4.3	Contagem de leucócitos totais	53
2.4.4	Contagem diferencial de leucócitos	54
2.4.5	Determinação de hemoglobina	54
2.4.6	Índices hematimétricos absolutos	54
2.4.6.1	Volume corpuscular médio (VCM)	54
2.4.6.2	Hemoglobina corpuscular média (HCM)	55
2.4.6.3	Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)	55

2.5	Avaliação da concentração sérica de glicose, cortisol e hormônios gonadais.....	55
2.6	Análise estatística	56
3	RESULTADOS	58
3.1	Perfil hormonal e parâmetros hematológicos de machos de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>).....	58
3.2	Perfil hormonal e parâmetros hematológicos de fêmeas de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>).....	61
3.3	Hematologia de machos e fêmeas de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) antes a após a aplicação de EBHC	63
4	DISCUSSÃO	67
5	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	72
	ARTIGO 2 Avaliação de parâmetros reprodutivos em curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) durante o período reprodutivo	78
1	INTRODUÇÃO	80
2	MATERIAL E MÉTODOS	82
2.1	Seleção de reprodutores	82
2.2	Medidas morfométricas e indução hormonal	82
2.3	Parâmetros reprodutivos da fêmea.....	84
2.4	Parâmetros reprodutivos do macho.....	85
2.5	Taxa de fertilização	86
2.6	Coleta de sangue.....	86
2.7	Avaliação da concentração sérica de glicose, cortisol e hormônios reprodutivos	87
2.8	Análise estatística	87
3	RESULTADOS	89
3.1	Resultados referentes aos parâmetros reprodutivos dos machos de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>).....	89
3.2	Resultados referentes aos parâmetros reprodutivos das fêmeas de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>).....	93
4	DISCUSSÃO	97
5	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	103

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O desaparecimento dos estoques naturais de peixes nativos está relacionado com os impactos causados pela construção de hidroelétricas, pela urbanização, agricultura e introdução de espécies exóticas (CAROLSFELD; GODINHO; ZANIBONI FILHO, 2003). As grandes barragens constituem obstáculo à rota migratória dos peixes de piracema, reduzindo a eficiência reprodutiva destas espécies (BEDORE, 1999). Além disso, a sobrepesca, a captura em períodos de desova e a diminuição da qualidade da água (ANDRADE et al., 2002) contribuem para o declínio dos estoques naturais de peixes, sendo cada vez mais necessária a produção em cativeiro.

Os peixes migradores não desovam em cativeiro sendo necessária a manipulação artificial do ciclo reprodutivo e os peixes de piracema constituem parte significativa da piscicultura nacional e da ictiofauna brasileira. A indução da reprodução com aplicação de hormônios que induzem à maturação final e à liberação dos gametas constitui-se uma técnica eficiente, permitindo que os peixes reofílicos completem seu ciclo reprodutivo no momento desejado e em condições controladas (GODINHO, 2007).

O conhecimento da biologia das espécies, principalmente, no que se refere aos aspectos reprodutivos, é fundamental quando se deseja realizar a criação intensiva de peixes (ANDRADE et al., 2002; GODINHO, 2007). A utilização das técnicas de propagação artificial, aliada ao estudo da biologia das espécies, pode aperfeiçoar a produção e, também, a sobrevivência das proles.

Além disso, pode ser uma ferramenta útil em atividades de criação e de repovoamento. Alguns aspectos referentes à biologia reprodutiva básica das espécies têm sido considerados particularmente importantes, como o tamanho

mínimo para a reprodução e as características do local de desova (PEREIRA, 2007).

O conhecimento sobre os parâmetros hematológicos em peixes tem sido estudado. A aquicultura, em especial a piscicultura, dispõe de uma série de ferramentas como a histologia, hematologia e química sanguínea, que tem sido aplicada com êxito como instrumentos de diagnóstico na ciência veterinária. Neste sentido, o seu conhecimento implica em maior entendimento anatômico, fisiológico e sanitário, os quais em conjunto determinam a conservação da sanidade, permitindo maiores índices reprodutivos em condições controladas (OLIVEIRA et al., 2009).

O conhecimento acerca dos valores de referência, em condições ambientais favoráveis, das características morfológicas das células e da metodologia empregada para realização dos exames hematológicos ainda apresenta controvérsias. Além disso, não há descrição de perfil hematológico em peixes em período reprodutivo e, com base na determinação dos parâmetros hematológicos normais dos peixes, é possível produzir uma tabela de valores de referência durante o período reprodutivo. Com o estabelecimento de um padrão de referência, torna possível a sua utilização para definir padrões patológicos onde os padrões hematológicos possam estar alterados. É possível, também, avaliar a influência de fatores externos como, por exemplo, alimentação, fotoperíodo e oxigenação sobre estes animais.

O objetivo geral do trabalho foi analisar o perfil hematológico e hormonal de curimba (*Prochilodus lineatus*), durante o período reprodutivo, correlacionando as diferenças encontradas com o estresse ocasionado pela indução hormonal e o processo reprodutivo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características biológicas da curimba (*Prochilodus lineatus*) (Valenciennes, 1837)

A curimba (*Prochilodus lineatus*), também conhecida como curimatã, curimbatá ou papa-terra, é uma das espécies do gênero *Prochilodus* que possuem ampla distribuição pela América do Sul. No Brasil, está presente em todas as principais bacias hidrográficas, sendo mais comum na bacia do Paraná (REIS; KULLANDER; FERRARIS JUNIOR, 2003).

A curimba possui boca circular, projetando-se um pouco para frente quando aberta, tem lábios grossos e móveis, providos de numerosos e minúsculos denticulos dispostos em duas séries. A curimba é uma espécie Iliófaga, que consome finas partículas do lodo, onde estão contidos sedimentos inorgânicos, que é a parcela mais considerável da dieta, além de detritos orgânicos e diatomáceas (FUGI; HAHN; AGOSTINHO, 1996).

Esta espécie oferece grandes vantagens à piscicultura, devido à rusticidade e à elevada taxa de crescimento (MURGAS et al., 2009). Quando bem alimentada, a curimba pode atingir 70 cm de comprimento e até 15 kg de peso corporal. É encontrado no leito dos rios, durante a época seca, nos trechos de águas mais calmas (FRANCISCATTO; MURGAS; MILLIORINI, 2002).

Na natureza, os ovos, larvas, alevinos e os adultos de curimba são importantes alimentos de muitas espécies de peixes predadores. Numerosas espécies de aves aquáticas também se alimentam desta espécie. Por esse motivo, são utilizadas nas pisciculturas em sistemas de consorciação com outras espécies (MURGAS et al., 2003).

O período reprodutivo da curimba inicia-se na primavera e tem seu pico no verão. É uma espécie que responde sem dificuldades à indução hormonal com uma grande capacidade de expansão de sua prole (MURGAS et al., 2009).

2.2 Fatores ambientais que influenciam a biologia de curimba

Os ritmos circadianos controlam os mecanismos bioquímicos e fisiológicos dos peixes, alterando a síntese e a liberação de hormônios, na circulação sanguínea. O período diurno é caracterizado por secreção de cortisol, insulina e catecolaminas enquanto o período noturno é dominado por hormônios como o GH, prolactina, TSH, arginina vasopressina (ADH) e melatonina. Esta liberação sincronizada ajuda no funcionamento adequado do cérebro, sistema endócrino e outros tecidos, maximizando a eficiência fisiológica dos organismos (MAYWOOD et al., 2007).

Os estímulos luminosos podem influenciar diretamente sobre estas sinalizações, estimulando-as ou inibindo-as, de modo que a manutenção dos reprodutores em pisciculturas pode alterar a eficiência reprodutiva dos cardumes. A luminosidade estimula a expressão de genes hipotalâmicos que controlam os ritmos biológicos e, conseqüentemente, pode controlar também o início dos eventos reprodutivos (CERMAKIAN et al., 2002).

Estas alterações fotoperiódicas influenciam também o horário de aplicação do hormônio. Avaliando a indução hormonal de tambaquis com extrato bruto de hipófise de carpa, Cermakian et al. (2002) verificaram que os peixes que receberam a segunda dose de hormônio durante a noite apresentaram maior desova e maior concentração sérica de estradiol. Da mesma forma, Felizardo et al. (2012) observaram que lambaris (*Astyanax bimaculatus*) que receberam a aplicação do hormônio no período da noite desovaram em menor horas grau.

A flutuação de temperatura também influencia no eixo hipotálamo-hipófise- gônada visto que peixes mantidos em temperatura variando entre 19-25 °C apresentaram maior índice gonadossomático, maior expressão de RNAm para GnRH, FSH e LH. Indicando que a temperatura adequada é importante para liberação das gonadotrofinas responsáveis pelo desenvolvimento e maturação gonadal.

As variações hormonais, provocadas pela ação dos hormônios hipotalâmicos e gônadas podem, assim como as próprias alterações ambientais, interferir nos processos fisiológicos dos teleosteos e os parâmetros hematológicos podem servir como um indicador dessas alterações.

Além disso, os parâmetros hematológicos de espécies tropicais de interesse comercial são uma ferramenta importante para a vigilância epidemiológica e manutenção sanitária dos cardumes comerciais. Esses parâmetros hematológicos e a bioquímica sanguínea podem ser usados como indicadores rápidos de perturbações fisiológicas, que podem afetar a sanidade das pisciculturas (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Existe uma necessidade de estabelecimento de padrões hematológicos em peixes para fazer o diagnóstico de quadros patológicos. Além disso, estes padrões sofrem influência genética (GREGÓRIO et al., 2013) e do ambiente em que estas espécies habitam.

A aquicultura, em especial a piscicultura, dispõe de uma série de ferramentas como a histologia, hematologia e química sanguínea, que tem sido aplicada com êxito como instrumentos de diagnóstico na ciência veterinária. Neste sentido, o seu conhecimento implica maior entendimento anatômico, fisiológico e sanitário, os quais em conjunto determinam a conservação da sanidade, permitindo maiores índices reprodutivos em condições controladas (OLIVEIRA et al., 2009).

O conhecimento acerca dos valores de referência, em condições ambientais favoráveis, das características morfológicas das células e da metodologia empregada para realização dos exames hematológicos ainda apresenta controvérsias. As referências encontradas e a bibliografia disponível são escassas, havendo necessidade de informações variadas a respeito das diferentes espécies de peixes tropicais nativos, com potencial de produção.

Com a determinação dos parâmetros hematológicos normais dos peixes é possível produzir uma tabela de valores de referência durante o período reprodutivo. Pelo estabelecimento de um padrão de referência, torna possível a sua utilização para definir padrões patológicos onde os padrões hematológicos possam estar alterados. É possível, também, avaliar a influência de fatores externos como, por exemplo, alimentação, fotoperíodo e oxigenação, sobre estes animais.

2.3 Parâmetros hematológicos em peixes teleósteos

As células progenitoras hematopoiéticas do teleósteo são produzidas, durante a formação embrionária, em uma região específica denominada aorta-gônada-mesonefron (AGM). Essas células se alojam no rim e os diferentes progenitores dão origem a todos os tipos celulares que compõem o sangue (OLIVEIRA et al., 2009). Portanto, em peixes adultos os órgãos encarregados pela hematopoese são o interstício renal e estroma esplênico. O sistema imunológico em termos gerais é muito similar ao dos vertebrados superiores.

A resposta imunológica de todos os vertebrados, incluindo os peixes, pode ser dividida em dois tipos. Primeiro, a resposta imune inata ou primária, que consiste em uma série de mecanismos filogenéticos antigos, que podem eliminar os patógenos do organismo ou bloquear sua entrada de forma inespecífica. O segundo meio é constituído pela resposta imune específica,

induzida por um antígeno específico e que requer a presença dos linfócitos. A denominação da resposta combinada se deve aos elementos que são ativados: a resposta humoral é mediada por anticorpos e a resposta celular, mediada por linfócitos T (MALARVIZSHI et al., 2012).

A classificação dos leucócitos dos teleósteos é semelhante a dos vertebrados e realizada por critérios morfológicos, segundo os quais são distinguíveis vários tipos celulares: linfócitos, granulócitos, monócitos e macrófagos (MALARVIZSHI et al., 2012). Os centros de melanomacrófagos podem ser precursores de centros germinativos presentes no baço e linfonodos. Ambos são agregados de células reticulares, linfócitos, plasmócitos e macrófagos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Esses centros melanomacrófagos possuem funções fisiológicas importantes como estocagem de eritrócitos, catabolismo e reaproveitamento de substâncias para o processo hematopoiético como o ferro. Nesses centros ainda ocorrem respostas inflamatórias, humorais e desintoxicação quando em contato com substâncias estranhas exógenas e endógenas (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

A quantidade de leucócitos circulantes no sangue é muito variável e dependente das espécies e condições fisiológicas sobre as quais elas se encontram. Por exemplo, em truta comum os leucócitos totais variam entre 2.000-63.000 leucócitos/mm³, segundo Blaxhall e Daisley (1973), enquanto em salmão encontraram uma média de 44.500 leucócitos/mm³.

Durante o processo de hematopoese e manutenção da resposta imune em peixes, fatores ambientais podem interferir na homeostase. Durante a vida do peixe o timo sofre involução semelhante ao que ocorre em mamíferos. Portanto, possivelmente o timo seja mais importante em peixes jovens (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Alterações ambientais como temperatura, mudança de pH, concentração osmótica, pluviosidade e, possivelmente, período reprodutivo podem produzir estresse e alterar o processo hematopoiético. Alterações de pH podem reduzir o número de eritrócitos e neutrófilos, enquanto a temperatura interfere na dinâmica de produção das células, sendo temperaturas mais baixas responsáveis pela inibição da produção de células. O inverso ocorre com temperaturas mais altas que promove um aumento da atividade hematopoiética (TAVARES-DIAS et al., 2008).

2.4 Células sanguíneas

As células sanguíneas de peixes teleósteos são produzidas em tecidos diferenciados e específicos sendo os mesmo desprovidos de medula óssea, porém as células sanguíneas periféricas são semelhantes aquelas encontradas em mamíferos.

2.4.1 Eritrócitos

Os eritrócitos são as células que aparecem em maior número no sangue circulante dos peixes teleósteos, cuja função é o transporte de gases desempenhado pelo seu principal componente, a hemoglobina. O tamanho e número de eritrócitos revelam variações entre as espécies e dependendo das condições fisiológicas e ambientais pode variar entre 1 e 3×10^6 /mm³ e com tamanho variando entre 7 e 36 μm . A função principal destas células é a troca gasosa carregando oxigênio e gás carbônico para os tecidos (SILVA et al., 2012).

Estudos demonstram que há uma relação entre o número de eritrócitos e o desempenho de atividade em teleósteos. Espécies mais ativas possuem maior número de eritrócitos, maior concentração de hemoglobina e menor volume.

Nesses peixes é maior a demanda de oxigênio e a taxa metabólica. Em espécies mais sedentárias esses valores se mostram inversos com menor número de eritrócitos, menor quantidade de hemoglobina e maior volume (VCM). Os valores de hematócrito também acompanham essa característica de comportamento (LABARRÉRE; FARIA; TEIXEIRA, 2012).

O eritrócito de teleósteos é similar em tamanho, propriedades tintoriais e ultraestruturais aos dos demais vertebrados, como aves, anfíbio e répteis. É nucleado, ovalado, com núcleo em posição central, com citoplasma abundante acidófilo com cromatina densa basófila. Os eritrócitos imaturos apresentam formas mais arredondadas, com cromatina frouxa e citoplasma basofílico (LABARRÉRE; FARIA; TEIXEIRA, 2012).

2.4.2 Leucócitos

Durante o processo de maturação dos leucócitos há uma redução no volume das células. Células imaturas podem ser observadas na circulação sanguínea dependendo das condições em que encontra o animal (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Na corrente periférica dos teleósteos podem ser encontrados linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células granulocíticas especiais. Essa ocorrência é muito semelhante ao que se encontra em mamíferos e aves (TAVARES-DIAS et al., 2008).

2.4.3 Linfócitos

São células altamente diferenciadas com capacidade de resposta frente aos estímulos imunológicos. O citoplasma apresenta um anel citoplasmático basofílico ao redor do núcleo, onde estão localizadas as mitocôndrias, retículo

endoplasmático liso e rugoso, ribossomos e aparato de Golgi, demonstrando o alto potencial metabólico destas células (HIGUCHI et al., 2011).

Os linfócitos, geralmente, apresentam projeções citoplasmáticas que facilitam sua diferenciação dos trombócitos, projeções descritas em estudos de microscopia eletrônica de transmissão. Foi, também, observado que os linfócitos possuem uma relação núcleo citoplasma muito grande cujo núcleo ocupa quase todo o citoplasma. Estudos demonstram que os linfócitos e neutrófilos são as células que ocorrem em maior percentual no sangue periférico dos peixes da família *Prochilodontidae* (TAVARES-DIAS et al., 2008).

Os linfócitos circulam por todo o corpo através do sangue e da linfa e se concentram nos órgãos linfoides (ROBERTS, 1989). Também aparecem em outros tecidos do peixe como a epiderme e tecidos afetados por processos inflamatórios (HIGUCHI et al., 2011).

Em nível funcional, os linfócitos são os responsáveis pela resposta imune específica humoral e celular, que se traduzem em produção de anticorpos, capacidade citolítica, memória imunológica e liberação de fatores reguladores da função imune, como as linfocinas (HIGUCHI et al., 2011).

Linfócitos T: denominados também linfócitos Ig-, pela falta de IgM em sua superfície, localizam-se, principalmente, no timo e respondem a substâncias mitogênicas como a concanavalina A e fitohemoaglutininas, podendo responder também a mitógenos de lipopolissacarídeos típicos de células B (HIGUCHI et al., 2011). Segundo Camargo, Pouey e Martins (2005), estas células respondem por 70% dos linfócitos circulantes totais, e as colorações por fosfatase ácida permitem diferenciá-los dos linfócitos B. Participam ativamente da resposta imune humoral, principalmente, frente a antígenos T-dependentes (NAKANDAKABE et al., 2013).

Linfócitos B: apresentam IgM em sua membrana plasmática, também conhecidos como linfócitos Ig+. Respondem aos mitógenos lipopolissacárides (LPS) e respondem a, aproximadamente, 30% dos linfócitos circulantes. Eles se localizam no baço, rim anterior e timo. São responsáveis diretos pela produção de anticorpos, frente a antígenos T-dependentes e T-independentes. Quando diferenciados, são denominados plasmócitos, porém relatos afirmam que são raros na circulação periférica (NAKANDAKABE et al., 2013).

Células Natural Killer (NK): relatos sugerem a presença de células semelhantes às células NK de mamíferos em teleósteos podendo desempenhar a mesma função daquelas encontradas em mamíferos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Para a diferenciação dos linfócitos, são necessários estudos de citoquímica e bioquímica para definir sua função em peixes teleósteos. Mas relatos sugerem a participação dos linfócitos nos processos inflamatórios (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

2.4.4 Monócitos/Macrófagos

São leucócitos que apresentam citoplasma azul - brilhante, quando corados com Giemsa, ocasionalmente vacuolizados, podendo ser observados prolongamentos citoplasmáticos. O núcleo apresenta volume médio e ocupa um terço do volume da célula. Sua forma varia entre redonda e ovalada apresentando pequenas reentrâncias riniformes e sua cromatina aparece dispersa (TAVARES-DIAS; SANDRIM; CAMPOS-FILHO, 1999).

Ultraestruturalmente o citoplasma é denso, com formações membranosas, grande número de corpos heterogêneos (fagossomos) e, ocasionalmente, apresentam grânulos de melanina. São PAS (ácido periódico de

Schiff) positivos e apresentam atividade de estearase inespecífica e fosfatase ácida, concentrada nos grânulos. Os macrófagos são as principais células fagocíticas em peixes, por sua capacidade digestão de antígenos e restos celulares resultantes da resposta inflamatória e outros processos degenerativos (ZAMINHAM et al., 2012).

2.4.5 Granulócitos

A classificação e nomenclatura destas células, caracterizadas pela presença de grânulos citoplasmáticos, é controversa devido à grande variação entre as distintas espécies piscícolas e pela tentativa de comparação de suas características com granulócitos de mamíferos, que se dividem em neutrófilos, eosinófilos e basófilos, segundo propriedades tintoriais por corante Romanovsky (ZAMINHAM et al., 2012).

Em peixes teleósteos são descritos três tipos celulares, neutrófilos, basófilos e eosinófilos, de acordo com sua morfologia, porém nem sempre estão presentes todos os tipos na mesma espécie nem são comparáveis funcionalmente com seus análogos de mamíferos (ZAMINHAM et al., 2012).

Neutrófilos: estas células, denominadas também polimorfonucleares (PMNs) ou simplesmente granulócitos, caracterizam-se morfologicamente por um núcleo multilobulado, composto de dois a três lóbulos, com cromatina densa e agrupada, de coloração púrpura escura, quando corada com Giemsa ou Wright e pela presença de um citoplasma pouco corado, no qual se distinguem grânulos que variam desde o cinzento até o rosa pálido. Os grânulos apresentam forma arredondada ou ovalada, varia de tamanho e são eletrodensos. Seu tamanho é menor que os linfócitos e eritrócitos (ROSAS; LEHTI; MARMONTEL, 1999).

Eosinófilos: são descritos como células arredondadas que apresentam um núcleo bilobulado com citoplasma azul pouco corado e grânulos de forma

alargada e esférica, que são tingidos com corantes ácidos em meio alcalino. São denominados em teleósteos como HGEs (eosinófilos granulares homogêneos). A morfologia celular coincide com os eosinófilos de mamíferos, porém ainda não foi possível demonstrar analogia funcional similar (ZAMINHAM et al., 2012). Não existem, porém dúvidas de sua presença no sangue de ciprinídeos e peixes cartilaginosos. Sua função não está clara, acredita-se que intervém no processo de inflamação e defesa celular mediante desgranulação, sendo comparados com mastócitos em mamíferos, distribuindo-se analogamente (ZAMINHAM et al., 2012).

Basófilos: são descritos como células que apresentam citoplasma ligeiramente basofílico e grandes grânulos arredondados, que ocultam o núcleo, sendo semelhantes aos basófilos e mastócitos de mamíferos. Não se conhece muito de sua estrutura e, segundo estudos ultraestruturais e citoquímicos, podem ser confundidos com eosinófilos. Não é possível também se fazer analogias com as células de mamíferos. Estão ausentes na circulação periférica da espécie de salmonídeos (ZAMINHAM et al., 2012).

2.4.6 Trombócitos

São células de formato fusiforme, porque apresentam um polo em forma de ponta, podendo apresentar citoplasma abundante, com núcleo e membranas bem desenvolvidas. Pode-se observar no trombócito uma membrana vacuolada refringente, acompanhada de outras interconexões e ramificações dentro do citoplasma. Os trombócitos podem variar a forma e parecer arredondados, alargados, sendo os redondos, características de células imaturas (TAVARES-DIAS et al., 2008).

Os trombócitos apresentam um papel importante dentro do processo de coagulação sanguínea. Porém, podem atuar como um sistema de defesa por meio

de atividade fagocítica e bactericida apresentando uma relação estreita com os macrófagos (CAMPBELL; POTTINGER; SUMPTER, 1994). O número e atividade dos trombócitos variam entre as espécies e, dentro de uma mesma espécie, dependendo do estado fisiológico e das condições ambientais (TAVARES-DIAS et al., 2008).

3 ASPECTOS REPRODUTIVOS EM PEIXES

3.1 Hormônios hipofisários e gonadais em fêmeas

Os ovários dos peixes estão localizados na cavidade abdominal, dorsal ao intestino e uma película de tecido epitelial chamado mesovário o recobre inteiramente. Associado ao mesovário está presente uma cápsula de tecido conjuntivo associado a músculo liso, chamada túnica albugínea. Os peixes teleósteos apresentam dois tipos de ovários: gymnovários e cistovários e as curimbas apresentam o último tipo. A ovulação destes peixes ocorre no lúmen gonadal, ao qual são adicionados a um fluído originado do epitélio gonadal (PODHOREC et al., 2012).

Os ovários são constituídos de células germinativas, oogônias e oócitos. As oogônias são células pequenas e arredondadas que dão origem aos oócitos por meio da meiose e estão localizadas na parede do ovário (SALLUM, 1999). Os oócitos sofrem divisões meióticas e param seu desenvolvimento na primeira prófase meiótica, após a extrusão do primeiro corpúsculo polar (GRANDI; COLOMBO, 1997). O oócito secundário, durante o processo de maturação, termina o processo de meiose, extrusando o segundo corpúsculo polar. Durante o crescimento folicular, conforme ocorre aumento de tamanho dos folículos, pela incorporação da vitelogenina, estes migram para o interior da gônada e, também, promovem o abaulamento da cavidade celomática.

Os ritmos circadianos controlam os mecanismos bioquímicos e fisiológicos dos peixes alterando a síntese e a liberação de hormônios na circulação sanguínea. A liberação sincronizada de hormônios ajuda no funcionamento adequado do sistema endócrino maximizando a eficiência fisiológica dos organismos (MAYWOOD et al., 2007). A luminosidade estimula a expressão de genes hipotalâmicos que controlam os ritmos biológicos e,

consequentemente, o início dos eventos reprodutivos (CERMAKIAN et al., 2002).

Nos peixes, o hipotálamo e a hipófise estão localizados na base do diencéfalo e são os principais centros que coordenam os eventos fisiológicos, particularmente, neuroendócrinos (ISEKI; NEGRÃO, 2003). O hipotálamo processa os estímulos externos e internos percebidos pelos peixes e inicia a cascata hormonal e fisiológica ligada à reprodução, pela estimulação da produção e liberação dos hormônios liberadores de gonadotrofina (GnRH) e dopamina, que, quando caem na corrente sanguínea, atuam diretamente na hipófise controlando a liberação e síntese das gonadotrofinas as quais são de grande importância prática na reprodução induzida em peixes desempenhando papel fundamental no desenvolvimento gonadal (KUBITZA, 2004).

O sistema hipotalâmico-hipofisário é responsável pelo início da foliculogênese. Inicialmente ocorre a liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e que posteriormente determina a liberação de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) pela hipófise (LUBZENS et al., 2010). O FSH estimula as células tecais a produzir testosterona, que é convertida em estradiol pela aromatase e, posteriormente, é secretado no sangue, processo chamado esteroidogênese, o que estimula o fígado a sintetizar a vitelogenina (LUBZENS et al.; 2010). Essa glicofosfoproteína é transportada para o folículo em crescimento e incorporado por pinocitose e serve como vitelo para o futuro embrião em desenvolvimento (COWAR; BROMAGE; HIBBITT, 2002; JALABERT, 2005; KUBITZA, 2004). Com a produção de quantidades adequadas de vitelo nos oócitos, que é característica de cada espécie de peixe, a síntese da vitelogenina cessa.

O aumento das concentrações de FSH também promove o reinício da meiose, que é caracterizada pela quebra da vesícula germinativa (GVBD), condensação do cromossomo, formação do fuso meiótico e progressão para a

fase II da meiose. Para tanto, o esteroide indutor de maturação (MIS) deve induzir a liberação do fator promotor de maturação (MPF) que estimula a expressão de genes relacionados ao controle do ciclo celular e a esteroidogênese (YAMASHITA et al., 2000).

O MPF estimula a produção de $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha,20\beta$ -DP) (MIS) pelas células da granulosa (NAGAHAMA et al., 1994).

As altas concentrações de MIS, durante a fase final da maturação oocitária, devem-se a um desvio da cascata enzimática responsável pela esteroidogênese que promove a diminuição da enzima aromatase (INGERS; KRAKK, 2006; SANDRA; NORMA, 2010; TOKARZ; MÖLLER; ANGELIS, 2015). Se levamos em consideração a esteroidogênese, o precursor dos esteróides é a pregnenolona que será convertida em progesterona (P4) e, posteriormente, pode ser metabolizada em 17-hidroxiprogesterona (17P4) pela 17α -hidroxilase (CYP17). A 17P4 é, posteriormente, convertida em androstenediona (AD) pela C17,20 liase (CYP17) ou em $17\alpha,20\beta$ -dihidroxiprogesterona ($17\alpha,20\beta$ -DP) pela 20β -hidroxiesteroide dehidrogenase (20β -HSD). A $17\alpha,20\beta$ -DP tem sido identificada como esteroide indutor de maturação (MIS) em diferentes espécies de teleósteos (FERNANDES et al., 2014; SCOTT; SUMPTER; STACEY, 2010).

O aumento da concentração de MIS promove uma retroalimentação positiva no aumento da concentração sérica de LH e, estes hormônios em conjunto determinam o fim do processo de maturação (RIME et al., 2015).

A ovulação caracteriza-se pelo rompimento dos folículos, liberando os oócitos na cavidade do ovário, sob o controle do hormônio prostaglandina/ MIS a partir da ação do LH (COWAR; BROMAGE; HIBBITT, 2002). O processo de desova ocorre quando a fêmea, na presença do macho ou por compressão abdominal, libera os oócitos com a finalidade de serem fertilizados pelos espermatozoides.

Os oócitos possuem a micrópila diferindo assim dos oócitos de mamíferos, pois seus espermatozoides não possuem acrossomo. Os espermatozoides penetram nos oócitos por essa pequena abertura na membrana. O tamanho da micrópila é espécie-dependente e geralmente permite a entrada de apenas um espermatozoide, prevenindo a poliespermia (COWAR; BROMAGE; HIBBITT, 2002).

Segundo Baldisseroto (2012), quando o oócito não é liberado, durante a desova, ele sofre atresia. O número de oócitos atrésicos pode aumentar se a fêmea não for colocada em condições ótimas para a reprodução. Além disso, o estresse causado pelo manejo também pode levar à atresia. Em condições naturais, a atresia é muito reduzida e sua ocorrência parece estar relacionada ao estresse da fêmea. A atresia é mais evidente em oócitos que estão em estágios finais de maturação.

3.2 Hormônios hipofisários e gonadais em machos

Os teleósteos machos possuem um par de testículos alongados que se encontra fixado na parede dorsal da cavidade do corpo. Em algumas espécies, pode ocorrer fusão dos testículos ou um deles não se desenvolve, de modo que o peixe apresenta apenas um testículo funcional (BALDISSEROTO, 2012). A morfologia testicular dos teleósteos é variável, mas podem ser evidenciados dois tipos distintos, lobular ou tubular (COWAR; BROMAGE; HIBBITT, 2002).

Os testículos do tipo lobular são mais comuns e consistem de numerosos lóbulos separados por uma camada de tecido conjuntivo. Cada lóbulo possui vários cistos onde as células germinativas (espermátogônias) estão em um mesmo estágio de desenvolvimento. Portanto, as células que estão nas fases iniciais da espermatogênese são encontradas juntas ao fundo cego dos túbulos e, com o desenvolvimento e maturação, vão migrando em direção ao ducto

espermático. Os testículos possuem células de Sertoli que são responsáveis pela nutrição das células germinativas, enquanto as células de Leydig têm como função a produção de esteroides que estimulam a gametogênese e o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários (BALDISSEROTO, 2012; COWAR; BROMAGE; HIBBITT, 2002; HAFEZ, 2004).

Em machos, o controle reprodutivo é determinado pelo aumento de 11-cetotestosterona (11-KT) plasmática que aumenta conforme a aproximação do período reprodutivo (BORG, 1994). O FSH estimula a síntese de 11-KT que promove a espermatogênese (ZHANG et al., 2010). No fim da gametogênese, a concentração de 11-KT local diminui, e a síntese de MIS aumenta, sob o efeito de LH (SCHULZ et al., 2010). O MIS promove a maturação dos espermátócitos, promovendo o início da meiose, a produção de fluído seminal pelos ductos eferentes e capacitação espermática por alteração do pH e fluidez do líquido seminal (SCOTT; SUMPTER; STACEY, 2010). Os espermatozoides maduros são liberados no líquido seminal para a formação do sêmen, que fica armazenado até a reprodução (MANANÓS; DUNCAN; MYLONAS, 2008).

Em machos, a androstenediona (AD) é a precursora da testosterona (T) e ambas são metabolizadas no testículo em 11 β -hidroxila (BT e BAD). A reação é catalisada pela enzima 11 β -hidroxilase (CYP11 β) (MIURA; MIURA, 2003). A 11-cetotestosterona (11-KT) é o andrógeno mais potente em machos teleósteos, que estimula características sexuais secundárias e influenciam na espermatogênese e comportamento reprodutivo (BORG, 1994). A 11-cetotestosterona estimula as células de Sertoli a produzirem ativina, a qual, juntamente com este hormônio, estimula a proliferação das espermatogônias. No fim da espermatogênese há uma diminuição dos níveis de FSH e 11-cetotestosterona e um aumento do LH e 17- β -hidroxiprogesterona que é essencial para espermiogênese e espermição (MIURA; MIURA, 2003).

A 11-cetotestosterona é responsável pelo início do processo da liberação dos espermatozoides na luz do testículo. O evento que precede a liberação do espermatozoide é a hidratação dos mesmos com o líquido seminal nas paredes do ducto espermático (OLIVEIRA et al., 2009; SALLUM, 1999).

Os espermatozoides de peixes são imóveis dentro dos testículos e sua motilidade inicia-se quando expostos ao ambiente aquático (COWAR; BROMAGE; HIBBITT, 2002) e a ativação do espermatozoide ocorre quando fatores químicos são alterados. Em peixes de água doce, a ativação do espermatozoide ocorre quando a osmolaridade da água é menor que a do seu plasma, o que permite o espermatozoide fecundar os oócitos (BALDISSEROTO, 2002; PODHOREC et al., 2012).

REFERÊNCIAS

ANDRADE-TALMELLI, E. F. et al. Reprodução Induzida da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876) (Characiformes, Bryconinae), mantida em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, p. 803-811, 2002. Suplemento.

BALDISSEROTO, B. **Fisiologia de peixe aplicada à piscicultura**. Santa Maria: UFSM, 2002. 212 p.

BEDORE, A. G. **Características criopreservação do sêmen de Pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine haematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, London, v. 5, p. 771-781, 1973.

BORG, B. Androgens in teleost fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 109C, n. 3, p. 219-245, Nov. 1994.

CAMARGO, S. O.; POUHEY, J. L.; MARTINS, C. Parâmetros eritrocitários do jundiá (*Rhamdia quelen*) submetido à dieta com diferentes níveis de proteína. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1406-1411, 2005.

CAMPBELL, P. M.; POTTINGER, T. G.; SUMPTER, J. P. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 120, n. 1/2, p. 151-169, Feb. 1994.

CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI FILHO, E. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 63, p. 472-489, 2003.

CERMAKIAN, N. et al. Light induction of a vertebrate clock gene involves signaling through blue-light receptors and MAP kinases. **Current Biology**, London, v. 12, n. 10, p. 844-848, May 2002.

COWAR, K.; BROMAGE, N. R.; HIBBITT, O. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 12, n. 1, p. 33-58, Mar. 2002.

FELIZARDO, V. O. et al. Reproductive efficiency in native species of freshwater fish. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 22, n. 1, p. 197-206, 2012.

FERNANDES, D. et al. The in vitro interference of synthetic progestogens with carp steroidogenic enzymes. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 155, p. 314-321, Oct. 2014.

FRANCISCATO, R. T.; MURGAS, L. D. S.; MILLIORINI, A. B. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 213-215, 2002.

FUGI, R.; HAHN, N. S.; AGOSTINHO, A. A. Feeding of five species of bottom feeding fish of the Paraná River (PR, MS, Brasil). **Environmental Biology of Fishes**, Dordrecht, v. 46, n. 3, p. 297-307, 1996.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 351-360, jul./set. 2007.

GRANDI, G.; COLOMBO, C. Development and early differentiation of gonad in the European eel (*Anguilla Anguilla* L.), *Anguilliformes, Teleostei*): a cytological and ultrastructural study. **Journal of Morphology**, New York, v. 231, n. 2, p. 195-216, Feb. 1997.

GREGÓRIO, S. F. et al. Adaptation to different salinities exposes functional specialization in the intestine of the sea bream (*Sparus aurata* L.). **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 216, n. 1, p. 470-479, Feb. 2013.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. 513 p.

HIGUCHI, L. H. et al. Avaliação eritrocitária e bioquímica de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetidos á dieta com diferentes níveis proteicos e energéticos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 70-75, 2011.

INGERS, J. S.; KRAAK, G. J. van der. Characterization of the mRNA expression of StAR and steroidogenic enzymes in zebrafish ovarian follicles. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 954, n. 8, p. 943-954, Aug. 2006.

ISEKI, K. K.; NEGRÃO, J. A. Controle neuroendócrino da reprodução de peixes teleósteos. **Revista de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 1, n. 1, p. 11-22, 2003.

JALABERT, B. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 45, n. 3, p. 261-279, May/June 2005.

KUBITZA, F. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. 4. ed. Jundiaí: Acqua Supre, 2004. 108 p.

LABARRÉRE, C. R.; FARIA, P. M. C.; TEIXEIRA, M. M. M. Eritrograma de híbridos de surubim (*Pseudoplatistoma reticulatum* x *P. coruscans*) mantidos em diferentes densidades de estocagem. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 2, p. 510-514, 2012.

LUBZENS, E. et al. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 165, n. 3, p. 367-389, Feb. 2010.

MALARVIZHI, A. et al. Carbamazepine induced enzymatic stress in gill, liver and muscle of a common carp, *Cyprinus carpio*. **Journal of King Saud University Science**, Algeria, v. 24, n. 2, p. 179-186, Apr. 2012.

MANANÓS, E.; DUNCAN, N.; MYLONAS, C. C. Reproduction and control of ovulation spermiation and spawning in cultured fish. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. (Ed.). **Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species**. Boca Raton: CRC, 2008. p. 3-80.

MAYWOOD, E. S. et al. Minireview: the circadian clockwork of the suprachiasmatic nuclei--analysis of a cellular oscillator that drives endocrine rhythms. **Endocrinology**, Baltimore, v. 148, n. 12, p. 5624-5634, Dec. 2007.

MIURA, T.; MIURA, C. I. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 181-186, Mar. 2003.

MURGAS, L. D. S. et al. Manipulação do ciclo e da eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 6, p. 70-76, 2009. Suplemento.

MURGAS, L. D. S. et al. **Reprodução/espécies próprias para a piscicultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 28 p.

NAGAHAMA, Y. et al. Regulation of oocyte maturation in fish. In: SHERWOOD, N. M.; HEW, C. L. (Ed.). **Fish physiology**. New York: Academic, 1994. p. 393-439.

NAKANDAKABE, I. B. et al. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilápias-do-Nilo: parâmetros hematológicos imunológicos e microbiológicos. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 121-135, 2013.

OLIVEIRA, C. et al. Monthly day/night changes and seasonal daily rhythms of sexual steroids in Senegal sole (*Solea senegalensis*) under natural fluctuating or controlled environmental conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, Oxford, v. 152, n. 2, p. 168-175, Feb. 2009.

PEREIRA, G. J. M. **Utilização de gonadotropina coriônica equina e/ou extrato bruto de hipófise de carpa na indução da reprodução de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2007. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

PODHOREC, P. et al. The effects of water temperature and hormone treatments on circulating LH and ovulation in tench (*Tinca tinca*). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 22, n. 3, p. 1-6, Sept. 2012.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JUNIOR, C. J. **Check list of the freshwater fisher of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 742 p.

RIME, H. et al. Effects of the anti-androgen cyproterone acetate (CPA) on oocyte meiotic maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 164, p. 34-42, July 2015.

ROBERTS, R. J. The immunology of teleost. In: _____. **Fish pathology**. London: Baillière Tindall, 1989. p. 135-150.

ROSAS, F. C. W.; LEHTI, K. K.; MARMONTEL, M. Hematological índices and mineral content of sérum in captive and wild amazonian manatees, *Trichechus inunguis*. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Cascavel, v. 2, n. 1, p. 37-42, 1999.

SALLUM, W. B. **Reprodução das principais espécies de peixes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 47 p.

SANDRA, G. E.; NORMA, M. M. Sexual determination and differentiation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 20, n. 1, p. 101-121, Mar. 2010.

SCHULZ, R. W. et al. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 165, n. 3, p. 390-411, Feb. 2010.

SCOTT, A. P.; SUMPTER, J. P.; STACEY, N. The role of the maturation-inducing steroid 17,20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, n. 1, p. 183-224, Jan. 2010.

SILVA, R. D. da et al. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 99-107, 2012. Suplemento.

TAVARES-DIAS, M. et al. Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 38, n. 4, p. 799-806, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Haematological evaluation of Tilapia Rendalli Boulenger, 1896 (*Osteichthyes: Cichlidae*) captured in a fee fishing farm in franca, São Paulo State Brazil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 1, p. 107-114, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E. F. S.; CAMPOS-FILHO, E. Características hematológicas de tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (*Osteichthyes, Characidae*) em sistema de monocultivo intensivo: II., leucócitos. **Revista Brasileira de Zoologia**, Viçosa, MG, v. 16, n. 1, p. 175-184, jan./fev. 1999.

TOKARZ, T. et al. Steroids in teleost fishes: a functional point of view. **Steroids**, Stoneham, v. 103, p. 123-144, Nov. 2015.

YAMASHITA, Y. et al. Molecular mechanisms of the initiation of oocyte maturation: general and species- specific aspects. **Progress in Cell Cycle Research**, New York, v. 4, p. 115-129, 2000.

ZAMINHAM, M. et al. Efeito da vitamina C sobre os parâmetros hematológicos de Kinguio (*Carassius auratus*). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 7, n. 2, p. 352-357, 2012.

ZHANG, W. L. et al. Molecular cloning of two isoforms of 11beta-hydroxylase and their expressions in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 1, p. 34-41, Jan. 2010.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 Avaliação dos parâmetros hematológicos em curimba (*Prochilodus lineatus*) durante período reprodutivo

Eliane Aparecida de Andrade¹, Mônica Rodrigues Ferreira Machado², Viviane de Oliveira Felizardo¹, Fabio Raphael Pascote Bruhn³, Rilke Tadeu Fonseca¹,
Isadora Lima Assis¹, Luis David Solis Murgas¹

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM A NBR 6022 (ABNT, 2003) -
ADAPTADO, CONFORME ORIENTA O MANUAL DE
NORMALIZAÇÃO DA UFLA.**

-
- ¹ Universidade Federal de Lavras, Setor de Fisiologia e Farmacologia, Departamento de Medicina Veterinária, Lavras, Minas Gerais, Brasil.
² Universidade Federal de Goiás/Jatai- GO.
³ Universidade Federal de Pelotas.

RESUMO

Considerando a importância do estudo sobre o comportamento hematológico de teleósteos, frente a condições de estresse, objetivou-se estudar a influência do perfil hormonal sobre o padrão hematológico de curimba (*Prochilodus lineatus*) frente a condições de estresse de manejo durante o período reprodutivo. Foi coletado sangue de machos e fêmeas de curimba, da estação de piscicultura da CEMIG de Itutinga/MG, para avaliação dos parâmetros hematológicos, durante os meses de reprodução (novembro/2013 a fevereiro/2014). Foram analisados o número total de eritrócitos e leucócitos, hemoglobina, hematócrito e contagem diferencial de leucócitos. Esses parâmetros foram relacionados com dosagem dos hormônios gonadais, estradiol, progesterona, testosterona, com o cortisol e a glicemia de machos e fêmeas de curimba. Os dados analisados demonstraram que houve diferenças estatísticas nas concentrações de glicose de machos e fêmeas e testosterona em machos ($p < 0,10$) ao longo do período reprodutivo. Nas dosagens de glicose, pôde ser observado que, ao longo do período reprodutivo, ocorreu uma oscilação entre os valores ao longo das semanas de coleta. A concentração de testosterona diminuiu com o tempo e teve sua menor concentração no meio do período reprodutivo e sua maior concentração no início do período. Entre os machos, os parâmetros hematológicos não apresentaram diferenças estatísticas para o perfil eritrocitário. O valor relativo de linfócitos, neutrófilos e monócitos oscilou, ao longo dos dias de reprodução, mostrando diferença estatística entre eles ($p < 0,10$). A quantidade relativa de linfócitos apresentou valores mais altos que os neutrófilos e a quantidade relativa de linfócitos foi aumentando ao longo dos dias de reprodução ($p < 0,10$). Observou-se que as concentrações dos hormônios reprodutivos e os parâmetros hematológicos das fêmeas não apresentaram diferenças estatísticas ao longo do período reprodutivo exceto para os monócitos ($p > 0,10$). Considerando os resultados, conclui-se que durante o período reprodutivo alterações no perfil hematológico de curimba (*Prochilodus lineatus*) podem ocorrer. Essas alterações, possivelmente, estão relacionadas à exposição dos reprodutores ao estresse ocasionado pelas modificações ambientais e fisiológicas durante o período reprodutivo e das condições de manejo. Alguns parâmetros hematológicos se alteram durante evento reprodutivo e podem ser utilizados para identificar o momento ideal da maturação gonadal. As alterações hematológicas, ocorridas durante o período reprodutivo, podem ser um indicativo da modulação e reparação tecidual durante e após a desova.

Palavras-chave: Hematologia. perfil hormonal. Estresse. Reprodução.

1 INTRODUÇÃO

Em peixes teleósteos os órgãos encarregados pela hematopoese são o interstício renal e estroma esplênico e, em menor proporção, localizam-se também no timo, baço e tecido linfoide associado à mucosa (MALT) (AGIUS, 1985; BERNSTEIN; SCHLUTER; MARCHALONIS, 1998; LAMERS; PARMENTIER, 1985). Nos últimos anos, as investigações sobre a fisiologia, filogenia e ontogenia do sistema hematopoiético e imunológico dos peixes aumentam, consideravelmente, sobretudo nas espécies que apresentam interesse econômico (HIBIYA, 1994; HINE, 1992). Porém os conhecimentos sobre os padrões hematopoiéticos e imunológicos dos peixes teleósteos são bastante escassos (AINSWORTH et al., 1990; CAMPELL; MURRU, 1990; MABILIA; SOUZA, 2006).

As células hematopoiéticas podem ser encontradas tanto no sangue circulante como nos tecidos e a classificação dos leucócitos dos teleósteos é semelhante à de outros vertebrados sendo determinadas a partir de características morfológicas que permitem classificá-los como linfócitos, neutrófilos, monócitos e macrófagos (ALCORN; MURRAY; PASCHO, 2002; BERNSTEIN; SCHLUTER; MARCHALONIS, 1998; BODAMMER, 1986; COLLAZOS; BARRIGA; ORTEGA, 1995; DHEER, 1988; MABILIA; SOUZA, 2006; MACARTHUR; FLETCHER, 1985).

A quantidade de leucócitos circulantes no sangue é muito variável e dependente da espécie e condições fisiológicas sobre as quais eles se encontram (BLAXHALL; DAISLEY, 1997; BLAXHALL; HOOD, 1985; ELLIS, 1977; TAVARES-DIAS et al., 2012). Para a manutenção da hematopoese e da resposta imune em peixes, fatores ambientais como temperatura (TUROSİK; KRUPTA; MESZARROS, 1985; ZILEGENFUSS; WOLKE, 1991), mudança de pH, concentração osmótica, pluviosidade podem produzir estresse e alterar o

processo hematopoiético (BLY; CLEM, 1992; CAMPELL, 1988; CLEM et al., 1984; KOLNER; KOTTERGA, 2002; TAVARES DIAS; MORAES, 2003).

Alterações de pH podem reduzir o número de eritrócitos e neutrófilos e temperatura interfere na dinâmica de proliferação das células, sendo temperaturas mais baixas responsáveis pela inibição da proliferação enquanto temperaturas mais altas promovem um aumento da atividade hematopoiética (CONROY, 1998; DELUCA; WILSON; WARR, 1983; DENTON; YOUSEF, 1975; DEXIANG; AINSWORTH, 1991; SYPEK; BURRESON, 1983). Além disso, os parâmetros hematológicos podem ser utilizados como indicadores de estresse e contaminantes ambientais como chumbo, hormônios, agrotóxicos (CAMARGO; POUHEY; MARTINS, 2005; JARAMILLO, 2005; KINKELIN; MICHEL; GHITTIONO, 1991; MABILIA; SOUZA, 2006).

Em tilápias, pode ser vista uma resistência à enfermidade por patógenos e tolerância a baixos teores de oxigênio dissolvido. Essas variações ambientais podem causar tanto estresse agudo quanto crônico. O estresse agudo, normalmente, ocorre durante o manejo, tempo de transporte e tempo de realização das biometrias (NAKANDAKABE et al., 2013; ROSAS; LEHTI; MARMONTEL, 1999). Enquanto o estresse crônico, que ocorre devido a alterações de pH, altas concentrações de amônia, poluentes orgânicos e inorgânicos, podemos identificar na redução do crescimento e ganho de peso, depressão do sistema imunológico (SILVA et al., 2012; TAVARES-DIAS; MORAES, 2003).

Para identificação de estresse, é utilizada a quantificação do cortisol, pois este hormônio regula a função osmótica e iônica, podendo também regular a glicogenólise e gliconeogênese hepática. Sendo assim, a quantificação plasmática de cortisol e a quantificação plasmática de glicose podem ser utilizadas como indicadores de estresse (HIGUCHI et al., 2011; SILVA et al., 2012; TAVARES-DIAS; MORAES, 2003). Quando as concentrações de cortisol

estão aumentadas, ocorre uma redução na capacidade de elaborar resposta imune humoral reduzindo assim a produção de anticorpos (SCHRECK; CONTRERAS-SANCHEZ; FITZPATRICK, 2001). Alterações nas concentrações de hormônios esteroides também podem influenciar diretamente os padrões de resposta imune (FURMAN et al., 2014; SCHREK et al., 2001).

Furman et al. (2014) destacam que em mamíferos há uma variação sexo específica na resposta imune diretamente relacionada com os hormônios sexuais. Em humanos, os hormônios esteroides podem se ligar a receptores intracelulares presentes nos leucócitos e ativar genes responsivos à ativação hormonal. Enquanto o estrógeno está associado com processos inflamatórios, podendo estimular a ativação de linfócitos e monócitos, os andrógenos suprimem a atividade de resposta imune aumentando a síntese de citocinas pro-inflamatórias.

Além disso, o estado de estresse em peixes promove uma maior liberação de glicocorticoides que pode promover alteração quantitativa dos leucócitos. O cortisol reduz a ação fagocitária e a migração de leucócitos para locais onde a resposta imune está acontecendo (MALARVIZHI et al., 2012; SILVA et al., 2012).

Outro fator que deve ser considerado é que animais com tamanhos diferentes liberam energia em quantidades diferentes, pois essa é proporcional ao tamanho corporal podendo interferir no quadro hematológico. Fatores como estado nutricional, sazonalidade, maturação gonadal, sexo, variação genética podem influenciar significativamente nos padrões hematológicos (TAVARES-DIAS et al., 2012).

Estresse com altos níveis de cortisol diminui a capacidade dos linfócitos em produzir anticorpos e pode levar a uma redução no número total de leucócitos nos órgãos imunes. Altas taxas de testosterona também podem levar à imunossupressão causando morte prematura dos leucócitos (SCHRECK, 2010;

SCHRECK; CONTRERAS-SANCHEZ; FITZPATRICK, 2001). Martins et al. (2004) também relatam que *S. trutta* submetida ao estresse de captura apresenta aumento na porcentagem de neutrófilos e diminuição na de linfócitos.

O estudo da composição e da função das células sanguíneas de peixe é fundamental para a avaliação fisiológica, bioquímica e patológica uma vez que diferentes agentes estressores podem promover alteração morfológica e quantitativa nos diferentes tipos celulares hematopoiéticos. Porém, há poucos relatos sobre o perfil hematológico de peixes em período de reprodução. Portanto o objetivo deste trabalho foi estudar a influência do perfil hormonal sobre o padrão hematológico de curimba (*Prochilodus lineatus*) frente a condições de estresse de manejo durante o período reprodutivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção e indução hormonal de reprodutores

O experimento foi conduzido na piscicultura da Estação ambiental de Itutinga/MG da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-CEMIG), no período reprodutivo 2013- 2014 (Piracema).

Os exemplares de curimba foram mantidos na EAI-CEMIG, em oito viveiros de terra com, aproximadamente, 322m², na densidade de um peixe por 8m². Os peixes foram alimentados *ad libitum* com ração extrusada, contendo 28% de proteína bruta (ração comercial), em frequência alimentar de três arraçoamentos diários.

Foram utilizados os dados reprodutivos de 30 fêmeas e 30 machos de curimba a partir do mês de novembro de 2013 até o final da reprodução que ocorreu no início de fevereiro de 2014.

Com o auxílio de redes de arrasto, os animais foram selecionados nos tanques escavados, pesados e medidos individualmente, identificados e transferidos para aquários de alvenaria (volume de 2000L) e mantidos em uma densidade de seis animais/aquário. A água dos aquários foi mantida com sistema de aeração constante e temperatura média de 28°C, controlada com termostato.

Todos os animais foram submetidos ao tratamento hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), em duas dosagens, para indução da espermição e desova. As doses prévias e definitivas consistiram de injeções intramusculares de 5,0 mg de EBHC kg⁻¹ de peso corporal para as fêmeas e 0,4mg de EBHC kg⁻¹ de peso corporal para os machos, próximo à base da nadadeira dorsal. O intervalo entre as aplicações do hormônio foi de 12 horas e o tempo entre a dose definitiva e a coleta de gametas foi em torno de 6 horas.

Os animais foram escolhidos aleatoriamente em cada coleta, nos meses de novembro e dezembro de 2013 e janeiro e fevereiro de 2014 conforme as condições apresentadas na tabela abaixo:

Coleta	Data da coleta	Pluviosidade (mm ³)	Temp °C (tanque)
01	19/11/2013	01	25,0
02	03/12/2013	27	23,5
03	10/12/2013	00	23,5
04	17/12/2013	00	23,5
05	21/01/2014	05	24,5
06	04/02/2014	00	25,1

Quadro 1 Esquema dos dias de coleta realizada durante o período reprodutivo

Em um segundo experimento, foi coletado sangue de machos (n=5) e fêmeas (n=6) de curimba, nos meses de janeiro (dias 21/01/2014 e 23/01/2014) e fevereiro (4/2/2014 e 6/2/2014). Foram realizadas duas coletas de sangue, a primeira coleta foi feita antes aplicação do EBHC e a segunda coleta foi feita, aproximadamente, 6 horas após a aplicação da segunda dose do EBHC. O intervalo entre as duas doses foi de 12 horas. Essas amostras foram posteriormente processadas para avaliação do perfil hormonal e parâmetros hematológicos.

2.2 Coleta de sangue

Cada animal foi retirado do aquário e contido em uma bancada, para a coleta do sangue, que foi conduzida antes da aplicação do EBHC nos dias reprodutivos citados no item 2.1. Para a coleta de sangue, foram utilizadas seringas de 3mL, com agulhas 25x7mm, ambientadas com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Foram coletados 2mL de sangue da veia

caudal de cada animal. O sangue foi armazenado a 8°C e os hemogramas realizados 6 horas após a coleta.

Após a coleta do sangue, as amostras foram levadas para o laboratório de análises do Biotério Central da UFLA/Lavras-MG para a realização dos hemogramas.

2.3 Preparação do esfregaço sanguíneo para contagem diferencial de leucócitos

Uma gota de sangue total foi colocada em uma lâmina de vidro e com uma lâmina de corrida posicionada em um ângulo de 45° com a primeira lâmina foi feito um movimento de deslizamento rápido arrastando o sangue de maneira uniforme formando uma camada fina e homogênea. Foram feitas triplicatas das lâminas para cada animal seguindo metodologia proposta por Ranzani- Paiva et al. (2013).

Par a coloração dos esfregaços, foi utilizado o método de panótipo rápido cujo kit possuía um fixador, corante ácido e outro básico (Panótipo rápido) (Labtest). Os reagentes foram colocados em cubetas de coloração, na ordem sequencial, citada acima. As lâminas foram imersas em cada reagente por três minutos. Após a coloração, as lâminas foram secas e guardadas em caixas apropriadas até o momento da análise.

2.4 Índices hematológicos

2.4.1 Determinação do hematócrito

O hematócrito estabelece o percentual de eritrócitos em volume total de sangue. A determinação deste valor foi realizada utilizando microcapilares de

vidro (Perfecta, São Paulo, SP) preenchidos em dois terços com sangue total. Uma das extremidades do capilar foi vedada com massa de vedação. Os microcapilares foram centrifugados utilizando microcentrífuga (Med-30, MedSteel) a 1500rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, os capilares foram lidos em uma escala de leitura para hematócrito e os percentuais anotados e tabulados.

2.4.2 Contagem de eritrócitos

A contagem dos eritrócitos foi feita pela contagem do número total de hemácias por milímetro cúbico de sangue. O sangue foi suspenso em solução de Natt-Herrick numa diluição de 1:200. Após a diluição a suspensão foi colocada em câmara de Neubauer e o número de células estabelecido pela soma do número de células presentes em cinco quadrantes de cada retículo e multiplicado por cinco, seguido pelo fator de diluição vezes 10^4 .

2.4.3 Contagem de leucócitos totais

Para a realização deste procedimento, foi preparada uma solução do sangue em solução de Natt-Herrick numa diluição de 1:100 com uma homogeneização de três minutos. A suspensão celular foi colocada em câmara de Neubauer para a contagem dos leucócitos. Os leucócitos foram contados nos quadrantes externos do retículo. O número de células contadas foi multiplicado pelo fator de diluição vezes 10^4 .

2.4.4 Contagem diferencial de leucócitos

Para análise e contagem diferencial das lâminas, foi utilizado microscópio ótico (Nikon E200) com aumentos de 400 e 1000 vezes. A contagem diferencial é uma contagem percentual que diferencia os leucócitos presentes em cada amostra de sangue.

2.4.5 Determinação de hemoglobina

A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, que se fundamenta na oxidação da carboxihemoglobina e oxihemoglobina, por meio do ferrocianeto de potássio. Esta solução transforma a hemoglobina em cianometahemoglobina. A reação foi feita utilizando kit de dosagem de hemoglobina (Labtest). A leitura foi feita em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda 540nm (Thermo Scientific Multiskan GO, USA) (CONROY, 1998).

2.4.6 Índices hematimétricos absolutos

2.4.6.1 Volume corpuscular médio (VCM)

É o volume médio de hemácias expresso em fentolitros. Este índice mede o volume ocupado por um eritrócito médio no sangue periférico, sendo determinado pela seguinte fórmula:

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{Eritrócitos totais (x } 10^6/\text{mm}^3)} = \text{fL}$$

2.4.6.2 Hemoglobina corpuscular média (HCM)

É o conteúdo médio de hemoglobina nas hemácias expresso em pictogramas e é determinado pela fórmula:

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb} \times 10}{\text{Eritrócitos totais (x } 10^6/\text{mm}^3)} = \text{pG}$$

2.4.6.3 Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

É a percentagem de hemoglobina em 100mL de hemácias. Este valor é determinado pela fórmula:

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hb} \times 100 \text{ g/dL}}{\text{Ht}}$$

2.5 Avaliação da concentração sérica de glicose, cortisol e hormônios gonadais

A quantificação da glicose foi realizada baseada no teste rápido utilizando o sistema Breeze©2 (Bayer Health Care, RJ). Após a coleta do sangue total de cada animal o teste foi realizado colocando uma gota do mesmo no *chip* de detecção.

Para a dosagem dos hormônios, foi coletado um mL de sangue por punção veia caudal utilizando-se anticoagulante EDTA. A coleta foi realizada antes da administração do EBHC. O sangue foi posteriormente centrifugado a 1500rpm por oito minutos. O plasma foi separado e armazenado a -80°C até o momento da quantificação dos hormônios.

Os hormônios foram quantificados utilizando ensaio imuno-enzimático (ELISA). Foram quantificados os hormônios 11-cetotestosterona, 17- β -estradiol, progesterona (Enzo Life Sciences) e o cortisol (Diagnostics Biochem Canada Inc) segundo recomendações do fabricante. Para a leitura dos testes, foi utilizado leitor de ELISA (Thermo Scientific Multiskan GO, USA), no comprimento de onda 405nm (estradiol, progesterona e testosterona) e 450nm (cortisol) de acordo com as recomendações contidas no manual do aparelho.

2.6 Análise estatística

Foram realizados testes de normalidade de *Shapiro-wilk* e de igualdade de variância de *Levene*, para avaliar a distribuição das variáveis contínuas, sendo detectado que algumas não apresentaram distribuição normal e/ou homocedasticidade. Essas variáveis foram expressas por meio da mediana e diferença interquartilica, enquanto as que apresentaram foram descritas pela média \pm desvio padrão.

Para avaliar diferenças nos hormônios sexuais e parâmetros reprodutivos de machos e fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*), entre as diferentes datas de coleta de sangue, durante o período de piracema, foram aplicados testes de ANOVA ou Kruskal-wallis, seguidos de testes de comparação múltipla de LSD (least significance difference) (MAROCO, 2010). Optou-se pelo teste de Kruskal-wallis quando não for observada distribuição normal dos dados pelo teste de Shapiro-wilk ou igualdade de variância pelo teste de Levene.

A avaliação da relação entre os parâmetros reprodutivos e os hormônios sexuais foi realizada, por meio de testes de correlação de Pearson ou Spearman, este quando não verificada distribuição normal dos dados pelo teste de Shapiro-wilk.

Para avaliar a existência de diferenças nos hormônios sexuais, parâmetros reprodutivos e sanguíneos de machos e fêmeas antes e após a aplicação do hormônio EBHC foram realizados testes t de Student ou Mann-whitney, este quando não foi verificada distribuição normal nos dados pelo teste de Shapiro-wilk. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do pacote estatístico SPSS[®] 20.0, considerando um nível mínimo de confiança de 90% ($p < 0,10$).

3 RESULTADOS

3.1 Perfil hormonal e parâmetros hematológicos de machos de curimba (*Prochilodus lineatus*)

Os valores médios da quantificação dos hormônios dos machos estão relacionados na Tabela 1. Os dados analisados demonstraram que houve diferenças estatísticas nas concentrações de glicose e testosterona ($p < 0,10$) ao longo do período reprodutivo. Nas dosagens de glicose, pôde ser observado que, ao longo do período reprodutivo, ocorreu uma oscilação entre os valores ao longo das semanas de coleta, sendo altos nas coletas 2, 4 e 6 e mais baixos nas coletas 1, 3 e 5. A concentração de testosterona teve seu menor valor na coleta 4 do período reprodutivo e sua maior concentração na coleta 1.

Tabela 1 Parâmetros hormonais e glicemia de machos de curimba (*Prochilodus lineatus*) (n=30) avaliados ao longo do período reprodutivo ($p < 0,10$)

<i>Coleta</i> (<i>semana</i>)	<i>Cortisol</i> * (<i>mg/dL</i>)	<i>Glicose</i> * (<i>mg/dL</i>)	<i>Testosterona</i> * (<i>pg/mL</i>)
01	42,7±11,2 ^a	85,3±16,9 ^b	148,4±33,8 ^a
02	31,8±21,7 ^a	160,2±55,5 ^a	73,7±8,9 ^b
03	40,5±6,2 ^a	56,5±8,2 ^b	81,8±22,5 ^b
04	35,6±6,5 ^a	101,7±26,7 ^a	46,6±6,6 ^c
05	38,6±3,5 ^a	48,5±9,5 ^b	61,8±21,8 ^b
06	37,7±1,2 ^a	104,1±1,6 ^a	83,2±18,6 ^b

*Médias seguidas de mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente.

Entre os machos, os parâmetros hematológicos não apresentaram diferenças estatísticas para o perfil eritrocitário (Tabela 2). Entretanto apresentaram diferenças estatísticas nas contagens diferenciais de linfócitos, neutrófilos e monócitos ($p < 0,10$). O valor relativo de linfócitos, neutrófilos e monócitos oscilou, ao longo dos dias de reprodução, mostrando diferença estatística entre os parâmetros ($p < 0,10$) (Tabela 3). A quantidade relativa de linfócitos apresentou valores mais altos que os neutrófilos e a quantidade relativa de linfócitos foi aumentando ao longo dos dias de reprodução (Tabela 3).

Tabela 2 Parâmetros eritrocitários de machos de curimba (*Prochilodus lineatus*) (n=30) coletados a longo do período reprodutivo ($p < 0,10$)

<i>Coleta</i> (semana)	<i>Hm</i> [*] ($\times 10^6 \mu\text{L}/\text{sg}$)	<i>Ht</i> [*] (%)	<i>Hb</i> [*] (mg/dL)	<i>VCM</i> ^{**} (<i>fL</i>) ^{***}	<i>HCM</i> [*] (<i>pg</i>)	<i>CHCM</i> [*] (g/dL)
01	1,5±0,1	-	-	-	-	-
02	1,9±0,7	48,5±10,4	-	-	-	-
03	1,4±0,6	48,0±14,8	10,1±1,8	311,4(76)	64,4±2,8	25,9±3,2
04	2,3±0,9	46,0±2,0	10,3±1,7	162,3(34)	52,0±3,2	34,2±2,1
05	1,4±1,0	39,5±9,7	9,8±2,6	253(123)	73,8±1,8	26,5±1,9
06	1,4±1,4	41,0±7,6	10,9±1,8	386(23)	82,3±1,2	25,2±2,2

Hm- hemácias; Ht- hematócrito, Hb- hemoglobina, VCM- volume corpuscular médio, HCM- hemoglobina corpuscular média; CHCM- concentração de hemoglobina corpuscular média; leuco- leucócitos, linfo- linfócitos, neut- neutrófilo; mono- monócitos

*dp=desvio padrão**DI=distância interquartílica (terceiro quartil – primeiro quartil)

*** ausência de normalidade na distribuição dos dados pelo teste de Shapiro-wilk no grupo macho.

Tabela 3 Parâmetros leucocitários de machos de curimba (*Prochilodus lineatus*) (n=30) avaliados a longo do período reprodutivo (p<0,10)

<i>Coleta</i> (<i>semana</i>)	<i>Leuco</i> [*] ($\times 10^4 \mu\text{L/g}$)	<i>Linfo</i> [*] (%)	<i>Neut</i> [*] (%)	<i>Mono</i> [*] (%)
01	-	-	-	-
02	-	-	-	-
03	2,0±2,4 ^b	69±4,8 ^a	24±3,2 ^a	7±2,2 ^a
04	2,8±6,5 ^a	76±3,9 ^b	19±4,9 ^a	2±1,7 ^b
05	1,8±1,3 ^a	87±2,9 ^a	9±2,9 ^b	4±1,2 ^a
06	3,1±1,4 ^a	77±3,1 ^{a,b}	7±2,1 ^b	2±2,1 ^b

leuco- leucócitos, linfo- linfócitos, neut- neutrófilo; mono- monócitos.

*dp=desvio padrão.

Letras diferentes, na coluna, indicam diferença significativa entre os parâmetros.

Os dados de correlação mostraram que houve uma correlação positiva da glicose e hemácias ($r=0,359$; $p=0,066$) e testosterona e hemácias ($r=0,516$; $p=0,006$). O cortisol apresentou uma correlação positiva com os neutrófilos ($r=0,408$; $p=0,032$) e monócitos ($r=0,408$; $p=0,032$). Entretanto o cortisol apresentou correlação negativa com linfócitos ($r=-0,436$; $p=0,023$) (Tabela 4).

Tabela 4 Coeficientes de correlação de Serman estatisticamente significativos entre os parâmetros hormonais e hematológicos de machos de curimba (*Prochilodus lineatus*) durante o período reprodutivo (p<0,10)

Parâmetro	Correlação [*]	Valor de p
Glicose x Hm	0,359	0,066
Testosterona x Hm	0,516	0,006
Período reprodutivo x linfócito [*]	0,418	0,030
Período reprodutivo x neutrófilo [*]	-0,360	0,065
Período reprodutivo x monócito [*]	-0,360	0,065
Cortisol x linfócito	-0,436	0,023
Cortisol x neutrófilo	0,408	0,032
Cortisol x monócito	0,408	0,032

*Correlação de Serman

3.2 Perfil hormonal e parâmetros hematológicos de fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*)

Observou-se que as concentrações dos hormônios reprodutivos das fêmeas não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,10$) ao longo do período reprodutivo (Tabela 5). Os resultados dos parâmetros hematológicos das fêmeas também não apresentaram diferenças estatísticas, ao longo do período reprodutivo (Tabela 6 e 7), exceto para os monócitos cujos valores relativos oscilaram ao longo do período reprodutivo (Tabela 7).

Tabela 5 Parâmetros hormonais e glicemia de fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*) (n=30) avaliados a longo do período reprodutivo ($p<0,10$)

Coleta (semana)	Cortisol* (mg/dL)	Glicose* (mg/dL)	Estradiol** (pg/mL)***	Progesterona* (pg/mL)
01	45,2±8,9	101,3±23,2	6255,7(1078)	33,5±8,1
02	42,3±6,1	106,8±56,9	8814,3(9892)	29,7±20,4
03	31,5±2,4	69,7±15,1	2001,0(1502)	39,9±3,2
04	34,3±8,6	113,5±27,3	6315,9(5635)	43,2±14,2
05	44,7±10,1	61,6±26,9	6954,9(1594)	39,5±9,9
06	42,2±7,4	80,8±19,3	6867,7(1678)	36,9±10,5

*dp=desvio padrão

**DI=distância interquartílica (terceiro quartil – primeiro quartil)

*** ausência de normalidade na distribuição dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk no grupo fêmea

Tabela 6 Parâmetros eritrocitários de fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*) (n=30) avaliados a longo do período reprodutivo (p<0,10)

Coleta (semana)	Hm* (x10 ⁶ µL/sg)	Ht* (%)	Hb* (mg/dL)	VCM** (fL)***	HCM* (pg)	CHCM* (g/dL)
01	1,8±1,5	42,0±3,6	-	-	-	-
02	1,8±2,8	36,3±4,3	-	-	-	-
03	1,7±0,9	47±13,1	8,9±0,2	137,9(92)	53,3±22,	22,7±5,1
04	2,2±0,6	38,8±2,9	8,4±2,1	206,3(522)	55,1±11,0	28,6±5,6
05	1,8±0,6	44,9±7,6	10,6±1,0	253,3(255)	70,2±12,6	25,6±9,5
06	2,1±0,5	45,0±6,6	9,2±2,4	325,7(134)	78,0±5,2	24,2±4,9

Hm- hemácias; Ht- hematócrito, Hb- hemoglobina, VCM- volume corpuscular médio, HCM- hemoglobina corpuscular média; CHCM- concentração de hemoglobina corpuscular média.

*dp=desvio padrão**DI=distância interquartilica (terceiro quartil – primeiro quartil)

*** ausência de normalidade na distribuição dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk no grupo fêmea

Por outro lado, em relação aos parâmetros leucocitários, ocorreu uma linfocitose ao longo do período, porém esse comportamento não foi observado em relação aos demais tipos celulares, exceto para os monócitos que apresentaram valores oscilantes ao longo desse período (p<0,10), (Tabela 7).

Tabela 7 Parâmetros leucocitários de fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*) (n=30) coletados a longo do período reprodutivo (p<0,10)

Coleta (semana)	Leuco ($\times 10^4$ $\mu\text{L}/\text{sg}$)*	Linfo* (%)	Neut* (%)	Mono* (%)
01	2,7 \pm 8,5 ^a	89 \pm 1,5 ^a	8,0 \pm 2,0 ^a	3,0 \pm 0,6 ^{b,c}
02	2,3 \pm 2,5 ^a	83 \pm 5,2 ^a	11 \pm 4,1 ^a	6,0 \pm 2,2 ^{a,b}
03	3,6 \pm 1,5 ^a	79 \pm 1,5 ^a	12 \pm 3,2 ^a	9,0 \pm 3,5 ^a
04	1,3 \pm 3,8 ^a	76 \pm 5,0 ^a	17 \pm 5,0 ^a	7,0 \pm 2,6 ^a
05	1,3 \pm 5,6 ^a	81 \pm 6,7 ^a	17 \pm 6,0 ^a	2,0 \pm 1,5 ^c
06	1,4 \pm 6,5 ^a	83 \pm 5,6 ^a	14 \pm 6,4 ^a	4,0 \pm 5,5 ^c

Letras diferentes, na coluna, indicam diferença significativa entre os parâmetros.

3.3 Hematologia de machos e fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*) antes a após a aplicação de EBHC

Os dados relativos às análises hematológicas, antes e depois da aplicação do EBHC, apresentaram variações, ao longo do período reprodutivo, em que os parâmetros leucocitários apresentaram diferenças estatísticas significativas tanto para fêmeas quanto para machos (p<0,10). Observou-se que os leucócitos apresentaram valores aumentados após a aplicação do EBHC, nas duas semanas estudadas (p<0,10) (Tabela 9 e 10).

Os leucócitos totais foram estatisticamente diferentes para fêmeas (Tabela 9) (p<0,10), mas não para os machos (Tabela 10) (p>0,10). Os linfócitos apresentaram um alto percentual, antes da aplicação do EBHC decaindo após a aplicação; os neutrófilos apresentaram comportamento inverso (tabela 9 e 10). Os percentuais de monócitos não foram estatisticamente diferentes para as fêmeas (p>0,10), (Tabela 9), porém foi diferente para os machos (p<0,10)

(Tabela 10). As células granulocíticas especiais CGE apresentaram diferença estatística, porém esses valores foram muito baixos ($p < 0,10$) (Tabela 10).

Tabela 8 Parâmetros bioquímicos e leucocitários de fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*) avaliados antes e depois* do estímulo com EBHC ($p < 0,10$)

Fêmeas**	Janeiro		Fevereiro	
	DIA 21/01 s/ EBHC	DIA 23/01 c/ EBHC	DIA 4/2 s/EBHC	DIA 6/2 c/EBHC
Cortisol	38,4±9,6 ^a	51,3±6,7 ^b	43,5±6,1 ^a	44±12 ^a
Glicose	70,2±34,6 ^a	215,6±71,5 ^b	77,2±19,6 ^a	71,4±5,9 ^a
Leuco 10 ⁴ cel/μL	0,5(2,0) ^a	0,8(1,4) ^a	1,3(0,5) ^a	2,4±0,5 ^b
Linfo (%)	80(12) ^a	7(47) ^b	84(11) ^a	92(90) ^a
Neutro (%)	12(10,5) ^a	91(53) ^b	13(11) ^a	6(91) ^a
Mono (%)	1(7,5) ^a	4(9) ^a	1(1,5) ^a	1(0,5) ^a
CGE (%)	1(2) ^a	0(0) ^b	1(1) ^a	0(0,5) ^a

*Parâmetros que apresentaram normalidade na distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk foram descritos por meio de média±desvio padrão e comparados pelo teste T de Student pareado e os que não apresentaram por meio de mediana (distância interquartílica) e teste de Wilcoxon

**A coleta pós o estímulo hormonal foi realizada 6h após aplicação do EBHC. Letras diferentes, nas linhas e dentro de cada mês de coleta, indicam diferenças significativas entre os parâmetros.

EBHC=extrato bruto de hipófise de carpa

CGE=células granulocíticas especiais

Tabela 9 Parâmetros bioquímicos e leucocitários de machos de curimba (*Prochilodus lineatus*) avaliados depois do estímulo com EBHC ($p < 0,10$)

Machos	Janeiro		Fevereiro	
	DIA 21/01 s/ EBHC	DIA 23/01 c/ EBHC	DIA 4/2 s/EBHC	DIA 6/2 c/EBHC
Cortisol	41,3±9,1 ^a	43,6±12,6 ^a	43,2±6,9 ^a	43,9±13,9 ^a
Glicose	66,2±31,4 ^b	199,8±75,6 ^a	76,5±22,6 ^b	69,0±2,9 ^b
Leuco 10 ⁴ cel/μL	0,69±0,38 ^b	0,77±0,58 ^b	0,83±0,56 ^b	2,9±0,3 ^a
Linfo (%)	87,2±3,3 ^a	34,4±27,4 ^b	85,5±6,3 ^a	3,2±1,9 ^b
Neutro (%)	8,4± 2,9 ^b	52±20,3 ^a	14,7±6,2 ^b	95,0±2,4 ^a
Mono (%)	4±1,3 ^a	11±6,7 ^a	0,5±0,6 ^a	1,75 (1,3) ^a
CGE (%)	0,2±0,4 ^b	3,3±2,4 ^a	0,5±0,6 ^b	0±0 ^b

Média±desvio padrão

A coleta após o estímulo hormonal foi realizada 48h após aplicação do EBHC.

Letras diferentes, nas linhas dentro de cada mês, indicam diferenças significativas entre os parâmetros pelo Teste t de Student para amostras pareadas

EBHC=extrato bruto de hipófise de carpa

CGE=células granulocíticas especiais

Foram observadas as seguintes células: hemácias nucleadas características da espécie (Fig.1A), neutrófilos com núcleo bilobulado e citoplasma acidófilo (Fig.1B), monócitos com citoplasma abundante basofílico e núcleo apresentando reentrância (Fig.1C), linfócitos com diâmetro menor do que as outras células, em que o núcleo ocupa quase todo citoplasma e membrana plasmática apresentando prolongamentos (Fig.1D) e célula granulocítica especial com citoplasma abundante e característica acidófila, núcleo pequeno localizado periféricamente, característico desse tipo celular.

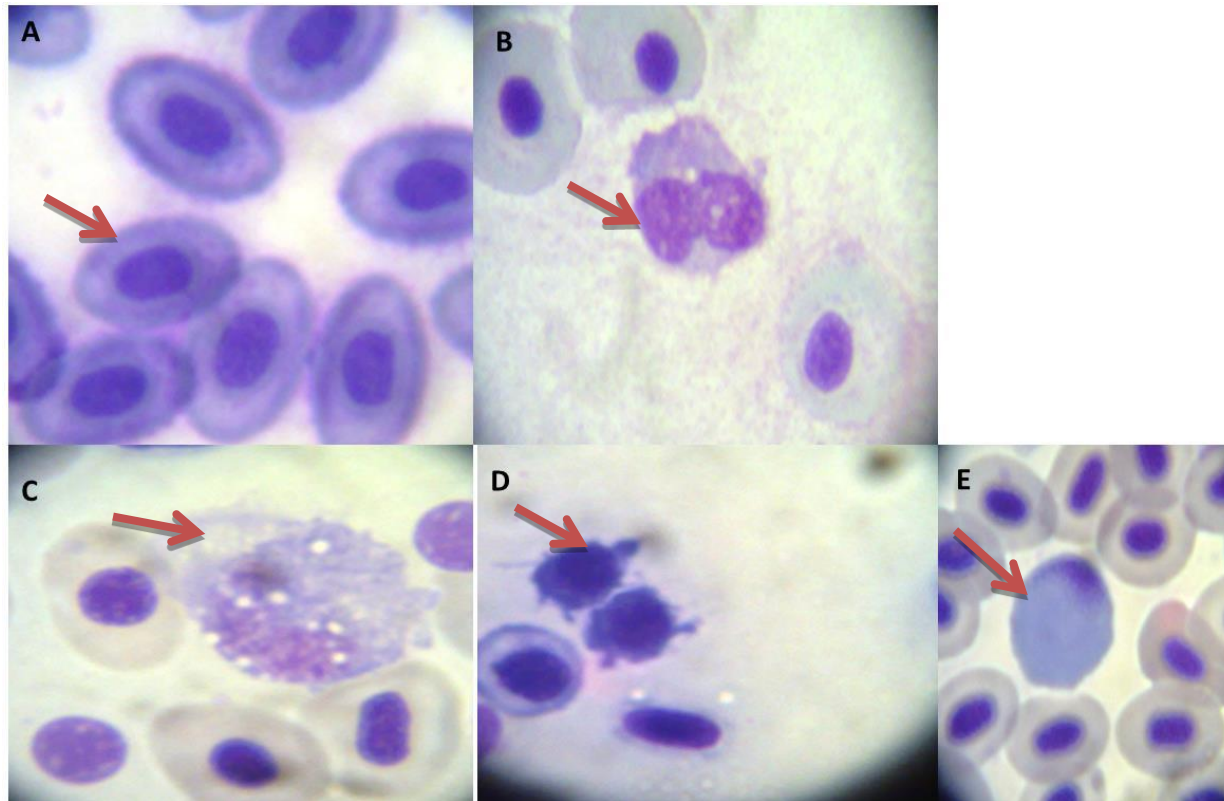


Figura 1 Leucócitos de sangue periférico de fêmea de curimba (*Prochilodus lineatus*). Células obtidas da contagem diferencial em sangue periférico em período reprodutivo. **A** – eritrócitos, **B**- neutrófilo, **C**- monócito, **D**- linfócito, **E**- CGE (coloração Panótipo rápido – Fotomicrografia aumento 1000x)

4 DISCUSSÃO

Em peixes teleósteos há registro de variações leucocitárias, causadas por estresse como alterações de temperatura, concentração osmótica, deficiência nutricional e patologias. Portanto, o estudo dos parâmetros hematológicos pode possibilitar o entendimento dos eventos imunes que ocorrem durante o período reprodutivo (TAVARES-DIAS; SANDRIM; CAMPOS-FILHO, 1999).

Considerando a pouca disponibilidade de literatura sobre quantificação leucocitária em peixes teleósteos, Tavares-Dias e Moraes (2003) descreveram os parâmetros hematológicos na família *Prochilodontidae*. Segundo Ranzani-Paiva (1996), a média de linfócitos em *Prochilodus lineatus* é de 30% no sangue periférico em peixes fora do período reprodutivo. Enquanto em neutrófilos e monócitos a média dos percentuais é de 51,7% e 9,7%, respectivamente.

Em nossos experimentos, foi encontrada uma média de 81,8% de linfócitos, sugerindo uma linfocitose no período reprodutivo. Entretanto o número total de leucócitos em machos pareceu não aumentar, enquanto em fêmeas ocorreu um aumento ao longo do período reprodutivo. Segundo Tavares-Dias e Moraes (2003), durante o processo de maturação gonadal, os valores leucocitários parecem aumentar ocorrendo um percentual elevado de linfócitos e neutrófilos.

Os linfócitos têm uma relevante função no sistema imunológico em mamíferos durante o processo reprodutivo. Pereira et al. (2005) descrevem a função imune dos linfócitos, durante a gestação em mulheres normais, onde os mesmos exercem um papel de modulação imunológica no útero, para que o aloenxerto seja bem sucedido. Em peixes, essas células podem estar envolvidas no processo de reorganização e cicatrização do ovário, durante e após a desova, uma vez que esse evento fisiológico promove uma reação inflamatória local com

liberação de citocinas antiinflamatórias e cicatriciais como INF- γ , TNF e prostaglandinas (PGs) (FURMAN et al., 2014).

Santos (2012) descreve a ação dos linfócitos Th2 e NKu nesse processo modulatório, pois com a IL-10 ocorre uma supressão do eventos pró-inflamatórios. A linfocitose observada nos resultados pode estar relacionada com um processo modulatório não relacionado ao sucesso de aloenxerto, mas com processo de desova. Em peixes foram identificadas células semelhantes à NK (TAVARES-DIAS; MORAES, 2003) e a função dessas células é bem estudada em mamíferos estando relacionada com a modulação imunológica no ambiente uterino. Tem sido demonstrado que a progesterona bloqueia o estimulador da proliferação mitogênica linfocitário, modula a produção de anticorpos, reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos e altera a secreção de citocinas pelos clones de linfócitos T favorecendo a produção de IL-10 (PEREIRA et al., 2005).

Pereira et al. (2005) relatam que algumas variáveis sanguíneas como hematócrito, concentração de hemoglobina e número relativo de linfócitos são indicadores da resposta ao estresse agudo em peixes. O aumento do cortisol promove um aumento da demanda de oxigênio e energia pelos tecidos, promovendo uma rápida produção e diferenciação da série vermelha, consequentemente, ocorre um aumento na taxa de hemoglobina e valores de hematócrito, sendo assim a hemoconcentração é um evento comum. Nesse trabalho não foi observado aumento nesses parâmetros podendo esse resultado estar relacionado com estresse crônico uma vez que os reprodutores passam por um processo de adaptação ao longo do período reprodutivo.

Em relação aos leucócitos, Pereira et al. (2005) descrevem que, na presença de estresse, o cortisol atua nos tecidos hematopoiéticos resultando em bloqueio na produção de linfócitos, monocitopenia e neutrofilia, como resposta imunossupressora. Em nossos achados, observou-se uma linfocitose associada

com neutropenia, sem grandes alterações no número de monócitos podendo isso ser atribuído à possível função dos linfócitos como moduladores e reparadores dos tecidos ovarianos lesados.

Entretanto, nos experimentos realizados antes e depois do estímulo hormonal, a quantidade relativa de linfócitos foi maior antes da aplicação do EBHC e a de neutrófilo foi menor. Porém, após a aplicação do EBHC, pode ser observada uma inversão nesses valores os quais aumentaram a quantidade relativa de neutrófilo e uma diminuição de linfócitos. Em condições de estresse pode ocorrer uma relação neutrófilo:linfócito positiva em que há a presença de uma neutrófila em resposta às alterações fisiológicas. Esse aumento no número de neutrófilo pode ocorrer pelo aumento nas concentrações plasmáticas de cortisol ou catecolaminas que promove um estímulo da proliferação da linhagem mieloide e da redução da migração dos neutrófilos para os tecidos periféricos, aumentando sua concentração no sangue circulante (ANDRADE et al., 2015; ROSA; VAISBERG, 2002; ZAZULA et al., 2008).

5 CONCLUSÕES

Alguns parâmetros hematológicos se alteram durante evento reprodutivo e podem ser utilizados para identificar o momento ideal da maturação gonadal. As alterações hematológicas ocorridas, durante o período reprodutivo, podem ser um indicativo da modulação e reparação tecidual durante e após a desova.

ABSTRACT

Teleost fish in the investigations on the physiology and function of the hematopoietic and immune systems of fish are greatly increased, especially in species with economic interest. The blood cells are found circulating in the blood and tissues. In teleosts can be found leukocytes with lymphocytes, neutrophils, monocytes and macrophages. Hematological parameters can be used as indicators of stress and environmental contaminants may be a good environmental indicator. Considering the importance of the study on hematological behavior of teleost front to stress conditions aimed to analyze the hematological profile of curimba (*Prochilodus lineatus*) during the reproductive period. Blood was collected from male and female curimba of fish culture station / Itutinga- MG for evaluation of haematological parameters during the months of reproduction (November / 2013 to February / 2014). The erythrocyte and leukocyte parameters were assessed, including the total number of leukocytes and erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, leukocyte count. These parameters were related to dosage of gonadal hormones and cortisol males and females curimba. The data showed that there were significant differences in glucose concentrations and testosterone ($p < 0.10$) throughout the reproductive period. The determination of glucose can be observed that over the reproductive period was an oscillation between values over the weeks of collection. The testosterone concentration had a lower concentration in the middle of the breeding season and its highest concentration at the beginning of the period. Among males, the hematological parameters were statistically similar to the erythrocyte profile. The relative value of lymphocytes, neutrophils and monocytes fluctuated over the days of breeding, showing statistical difference between them. The relative amount of lymphocytes showed higher values than neutrophils, and the relative amount of lymphocytes increased during the reproduction days. It was observed that the concentrations of reproductive hormones in females did not differ during the reproductive period. The results of haematological parameters of females did not show statistical differences during the reproductive period, except for monocytes whose relative values fluctuated during the reproductive period. Considering the findings concluded that during the reproductive period changes in hematologic curimba profile (*Prochilodus lineatus*) may occur. These changes are possibly related to the exposure of breeders to stress caused by environmental and physiological changes during the reproductive period and management conditions. However, our findings are not conclusive studies are necessary on the relationship between hematological and immunological profile before and during the breeding season.

Keywords: Hematological. Hormonal profile. Stress. Reproduction.

REFERÊNCIAS

AGIUS, C. The melano-macrophage centres of fish: a review. In: MANNING, M. J.; TATNER, M. F. (Ed.). **Fish immunology**. London: Academic, 1985. p. 85-106.

AINSWORTH, A. J. et al. Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): leucocyte distribution and phagocyte function in the anterior Kidney at 10°C. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 100A, n. 4, p. 907-912, 1991.

ALCORN, S. W.; MURRAY, A. L.; PASCHO, R. J. Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*onchorhyncus nerka*). **Fish and Shellfish Immunology**, New York, v. 12, n. 4, p. 303-334, Apr. 2002.

ANDRADE, E. F. et al. adaptation to physical training in rats orally supplemented with glycerol. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 93, n. 1, p. 1-7, Jan. 2015.

BERNSTEIN, R. M.; SCHLUTER, S. F.; MARCHALONIS, J. J. Immunity. in: EVANS, D. H. (Ed.). **The physiology of fishes**. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 1998. p. 215-242.

BLAXHALL, P. C. Y.; DAISLEY, K. W. Routine haematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, London, v. 5, n. 1, p. 771-781, Nov. 1997.

BLAXHALL, P. C. Y.; HOOD, K. Cytochemical enzyme staining of fish lymphocytes separated on a Percoll gradient. **Journal of Fish Biology**, London, v. 27, p. 749-755, 1985.

BLY, J. E.; CLEM, L. W. Temperature and teleost immune functions. **Fish and Shellfish Immunology**, New York, v. 2, n. 3, p. 159-171, 1992.

BODAMMER, J. E. Ultrastructural observations on peritoneal exudate cells from the striped bass. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 12, p. 127-140, 1986.

CAMARGO, S. O.; POUHEY, J. L.; MARTINS, C. Parâmetros eritrocitários do jundiá (*Rhamdia quelen*) submetido à dieta com diferentes níveis de proteína. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1406-1411, 2005.

CAMPELL, T. W. Fish cytology and hematology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 18, p. 349-364, 1988.

CAMPELL, T. Y.; MURRU, F. An introduction to fish hematology. **The Compendium-Small Animal**, São Paulo, v. 12, p. 525-533, 1990.

CLEM, L. W. et al. A temperature mediated process in telost immunity: differential effects of *in vitro* and *in vivo* temperature on mitogenic responses of channel catfish lymphofites. **Developmental & Comparative Immunology**, New York, v. 8, p. 313-322, 1984.

COLLAZOS, M. E.; BARRIGA, C.; ORTEGA, E. Seasonal changes in phagocytic capacity and superoxide anion production of blood phagocytes from tench (*Tinca tinca*, L.). **Journal of Comparative Physiology B**, Berlin, v. 165, n. 1, p. 71-76, Apr. 1995.

CONROY, D. A. **Manual de métodos y técnicas de laboratorio de uso comum en la hematología pisciaria, facultad de ciencias, departamento de biología, microbiología y bacteriología**. Maracay: Universidad Nacional de Santa, 1998. 22 p.

DELUCA, D.; WILSON, M. Y.; WARR, G. W. Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 13, p. 546-551, 1983.

DENTON, J. E.; YOUSEF, M. K. Seasonal changes in hematology of rainbow trout, *salmo gairneri*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 51A, n. 1, p. 151-153, 1975.

DEXIANG, C.; AINSWORTH, J. Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): II., adaptation of anterior Kidney phagocytes to 10°C. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 100A, p. 913-917, 1991.

DHEER, J. M. S. Haematological, haematopoietic and biochemical responses to thermal stress in an air-breathing freshwater fish, *Channa Punctatus* Bloch. **Journal of Fish Biology**, London, v. 32, p. 197-206, 1988.

ELLIS, A. E. The leucocytes of fish: a review. **Journal of Fish Biology**, London, v. 11, p. 453-491, 1977.

FURMAN, D. et al. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to Influenza vaccination. **PNAS**, Washington, v. 111, n. 2, p. 869-874, 2014.

HIBIYA, T. Normal and pathological features. In: _____. **Atlas of fish histology**. Arava: Charitable Foundation, 1994. p. 5-125.

HIGUCHI, L. H. et al. Avaliação eritrocitária e bioquímica de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetidos á dieta com diferentes níveis proteicos e energéticos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 70-75, 2011.

HINE, P. M. The granulocytes of fish. **Fish and Shellfish Immunology**, New York, v. 2, p. 79-88, 1992.

JARAMILLO, N. **Estudio hematológico básico del puye (*Galaxias maculatus*, *yenys*, 1942), en estado postlarval y adulto**. 2005. 87 p. Monografía (Grado Licenciado en Ciencias Acuícolas) - Universidad Cordoba, Temuco, 2005.

KINKELIN, P.; MICHEL, C. H.; GHITTIONO, P. **Tratado de las enfermedades de los peces**. Zaragoza: Acribia, 1991. 353 p.

KOLNER, B.; KOTTERGA, G. Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunization with *Aeromonas salmonisida*. **Fish and Shellfish Immunology**, New York, v. 12, n. 1, p. 35-48, Jan. 2002.

LAMERS, C. H. J.; PARMENTIER, H. K. The fate of intraperitoneally injected carbon particles in cyprinid fish. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 242, p. 499-503, 1985.

MABILIA, R. G.; SOUZA, S. M. G. Efeito do tratamento com diflubenzuron na hematologia de jundiás, *Rhamdia quelen* (*Pimelodidae*) infestados por *Lernaea cyprinacea* (*Copepoda*) em banhos de imersão de 24 horas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 159-163, 2006.

MACARTHUR, J. I.; FLETCHER, T. C. Phagocytosis in Fish. In: MANNING, M. J.; TATNER, M. F. (Ed.). **Fish immunology**. London: Academic, 1985. p. 29-46.

MALARVIZHI, A. et al. Carbamazepine induced enzymatic stress in gill, liver and muscle of a common carp, *Cyprinus carpio*. **Journal of King Saud University Science**, Algeria, v. 24, n. 2, p. 179-186, Apr. 2012.

MAROCO, J. **Análise estatística com utilização do SPSS**. 3. ed. Lisboa: Silabo, 2010. 824 p.

MARTINS, M. L. et al. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *oreochromis niloticus* submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 71-80, 2004.

NAKANDAKABE, I. B. et al. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilápias-do-Nilo: parâmetros hematológicos imunológicos e microbiológicos. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 121-135, 2013.

PEREIRA, A. C. et al. Immunity in the normal pregnancy and in the patient with systemic lúpus erythematosus (SLE). **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 134-140, 2005.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. Características sanguíneas da pirapitinga do sul, Bryconsp, sob condições experimentais de criação intensiva. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 141-153, 1996.

ROSA, L. F. P. B. C.; VAISBERG, M. W. Influências do exercício na resposta imune. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 167-172, 2002.

ROSAS, F. C. W.; LEHTI, K. K.; MARMONTEL, M. Hematological índices and mineral content of sérum in captive and wild amazonian manatees, *Trichechus inunguis*. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Cascavel, v. 2, n. 1, p. 37-42, 1999.

SANTOS, E. **Peixes da água doce: vida e costumes dos peixes do Brasil**. Belo Horizonte: Itatiaia, 2012. 268 p.

SCHRECK, C. B. Accumulation and long-term effects of stress in fish. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. (Ed.). **The biology of animal stress**. Wallingford: CAB International, 2010. p. 147-158.

SCHRECK, C. B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W.; FITZPATRICK, M. S. Effects of stress on fish reproduction, gamete, quality and progeny. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 3-24, June 2001.

SILVA, R. D. da et al. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 99-107, 2012. Suplemento.

SYPEK, J. P.; BURRESON, E. M. Influence of temperature on the immune response of juvenile summer flounder, *Paralichthys dentatus*, and its role in elimination of *Trypanoplasma bullocki* infections. **Developmental & Comparative Immunology**, New York, v. 7, p. 277-286, 1983.

TAVARES-DIAS, M. et al. Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 38, n. 4, p. 799-806, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Haematological evaluation of Tilapia Rendalli Boulenger, 1896 (*Osteichthyes: Cichlidae*) captured in a fee fishing farm in franca, São Paulo State Brazil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 1, p. 107-114, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: [s.n.], 2004. 144 p.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E. F. S.; CAMPOS-FILHO, E. Características hematológicas de tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (*Osteichthyes, Characidae*) em sistema de monocultivo intensivo: II., leucócitos. **Revista Brasileira de Zoologia**, Viçosa, MG, v. 16, n. 1, p. 175-184, jan./fev. 1999.

TUROSÍK, J.; KRUPTA, I.; MESZARROS, J. The effect of temperature channel on the haematological parameters in common cat fish (*Ictalurus nebulosus*, Lesueur, 1819). **Zivocisna Vyroba**, Hosín, v. 30, n. 10, p. 883-888, 1985.

ZAZULA, A. D. et al. Avaliação da relação neutrófilos/linfócitos em pacientes com suspeita de síndrome coronariana aguda. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 90, n. 1, p. 31-36, 2008.

ZILEGENFUSS, M. C.; WOLKE, R. The use of fluorescent microspheres in the study of piscine macrophage aggregate kinetics. **Developmental & Comparative Immunology**, New York, v. 15, p. 165-171, 1991.

ARTIGO 2 Avaliação de parâmetros reprodutivos em curimba (*Prochilodus lineatus*) durante o período reprodutivo

Eliane Aparecida de Andrade¹, Mônica Rodrigues Ferreira Machado², Viviane de Oliveira Felizardo¹, Fabio Raphael Pascote Bruhn³, Rilke Tadeu Fonseca¹, Isadora Lima Assis¹, Luis David Solis Murgas¹

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM A NBR 6022 (ABNT, 2003) -
ADAPTADO, CONFORME ORIENTA O MANUAL DE
NORMALIZAÇÃO DA UFLA.**

¹ Universidade Federal de Lavras, Setor de Fisiologia e Farmacologia, Departamento de Medicina Veterinária, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

² Universidade Federal de Goiás/Jataí- GO.

³ Universidade Federal de Pelotas.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar os parâmetros reprodutivos utilizados, durante a seleção de reprodutores, para indução hormonal e correlacioná-los com o perfil hormonal em machos e fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*), induzidos com EBHC, ao longo do período reprodutivo. O experimento foi realizado na estação experimental de Itutinga no período de novembro 2013 a fevereiro de 2014. As fêmeas foram selecionadas por meio do abaulamento ventral e hiperemia da papila urogenital enquanto os machos que liberavam sêmen por uma leve compressão abdominal. Após a seleção, os reprodutores foram pesados e medidos o comprimento total e padrão e as medidas celomáticas. As medidas M1, M2 e M3 foram feitas, logo após a pesagem com o auxílio de um paquímetro, em que M1 foi feita na posição das nadadeiras peitorais, M2 entre as nadadeiras peitorais e papila urogenital e M3 na posição da papila urogenital. Após a realização das medidas, o sangue foi coletado pela punção venocaudal, com seringas contendo EDTA. Foram quantificados no plasma de cada reprodutor glicose, testosterona, 17- β -estradiol, progesterona e o cortisol. Foi verificado que as medidas morfométricas abdominais M1 e M2 não apresentam correlação com os parâmetros reprodutivos avaliados tanto para machos quanto para fêmeas. A testosterona não apresentou correlação com o abaulamento celomático ou com a qualidade dos gametas ($p>0,10$). Porém, ao longo do período reprodutivo, a testosterona apresentou um padrão de concentração em picos, que, provavelmente, está relacionada com o volume e concentração de espermatozoides. Para fêmeas não houve diferença estatística significativa na concentração plasmática de estradiol e progesterona e nenhuma correlação entre os hormônios com os parâmetros de qualidade de desova. Porém a concentração de glicose plasmática apresentou uma correlação positiva com abaulamento ventral, sugerindo uma alteração metabólica, para manutenção da energia. Portanto, conclui-se que os parâmetros morfométricos não são confiáveis para avaliação da maturação gonadal em machos e fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*). Em machos de curimba, a determinação da concentração plasmática de testosterona pode ser utilizada para identificação da qualidade espermática. As quantificações plasmáticas dos hormônios reprodutivos estradiol e progesterona não podem ser utilizadas para identificar a fase de maturação gonadal, pois as fêmeas já estão em vitelogênese completa.

Palavras-chave: Reprodução. Medidas morfométricas. Estradiol. Indução hormonal. Testosterona.

1 INTRODUÇÃO

Nos peixes o hipotálamo e a hipófise estão localizados na base do diencéfalo e são os principais centros que coordenam os eventos fisiológicos, particularmente neuroendócrinos (ISEKI; NEGRÃO, 2003). O hipotálamo processa os estímulos externos e internos percebidos pelos peixes e sintetiza o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Este hormônio posteriormente determina a liberação de hormônio folículo estimulante (FSH) (LUBENZ et al., 2010).

Em fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*), o hormônio FSH estimula as células tecais a produzir testosterona, que é convertida a 17- β estradiol, nas células da granulosa sendo, posteriormente, secretado no sangue. O hormônio 17- β estradiol estimula o fígado a sintetizar a vitelogenina. Após o término da vitelogênese, os níveis de 17- β estradiol diminuem, e os níveis de 17- α -20 β -P nas células da granulosa aumentam. Este hormônio é sintetizado a partir do aumento dos níveis plasmáticos do hormônio luteinizante (LH) determinando o término da maturação do ovócito (TOKARZ et al., 2015).

Em machos, o hormônio luteinizante (LH) induz as células de Leydig a produzirem testosterona que, associada ao hormônio folículo estimulante (FSH), estimula as espermatogônias a se diferenciarem em espermátócitos. O FSH estimula a síntese do hormônio 11-cetotestosterona (11-KT) que promove a espermatogênese (ZHANG et al., 2010). O hormônio 11-KT é responsável pelo início do processo da liberação dos espermatozoides na luz do testículo. O evento que precede a liberação do espermatozoide é a hidratação dos mesmos com o fluido seminal das paredes do ducto espermático (SALLUM, 1999).

Ainda sob o efeito do LH, a concentração de 11-KT local diminui e aumenta a síntese do esteroide indutor de maturação (MIS), promovendo o final da espermiogênese, início da meiose, produção de fluido seminal pelos ductos

eferentes e a capacitação espermática por alteração do pH (MIURA; MIURA, 2003; SCHULZ et al., 2010; SCOTT et al., 2006).

O processo de maturação final, a ovulação, a desova e a espermição são fases do desenvolvimento gonadal que podem levar algumas horas ou dias, dependendo da espécie (KUBITZA, 2004). Em ambientes naturais, a maturação final inicia-se com alterações ambientais, porém em cativeiro a maturação final só ocorre quando as condições são adequadas para a propagação e com regulação hormonal exógena (WOYNAROVICH; HORBÁTH, 1989). Para tanto, os reprodutores são selecionados, de acordo com características identificadas por Woynarovich e Hóvath (1989), ao indicar que fêmeas devem apresentar abdômen bem desenvolvido e macio ao toque, papila urogenital proeminente e de coloração rosada ou avermelhada e orifício genital ligeiramente aberto. Para os machos, ocorre a liberação de algumas gotas de sêmen sob leve compressão abdominal.

O estresse durante o período reprodutivo determina aumento dos níveis plasmáticos de cortisol e glicose (WOYNAROVICH; HORBÁTH, 1989). Este aumento do cortisol pode modular a liberação de hormônios inibitórios de gonadotrofinas podendo levar à inibição da reprodução (SHAHJAHAN; KITAHASHI; PARHAR, 2014). Conforme o estresse se torna crônico, os níveis de cortisol diminuem (TOKARZ et al., 2015), com as alterações do cortisol os níveis de glicose podem se alterar promovendo uma alteração do balanço energético o que poderia influenciar nos processos reprodutivos (SHAHJAHAN; KITAHASHI; PARHAR, 2014).

Assim este trabalho teve como objetivo determinar os parâmetros reprodutivos utilizados, durante a seleção de reprodutores, para indução hormonal e correlacioná-los com o perfil hormonal em machos e fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*) induzidos com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) ao longo do período reprodutivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção de reprodutores

O experimento foi conduzido na piscicultura da Estação ambiental de Itutinga/MG da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-CEMIG), nos meses de novembro e dezembro de 2013 e janeiro e fevereiro de 2014. Os exemplares de curimba (*Prochilodus lineatus*) foram mantidos na EAI-CEMIG, em oito viveiros de terra com, aproximadamente, 322m², na densidade de um peixe por 8m². Os peixes foram alimentados *ad libitum* com ração extrusada, contendo 28% de proteína bruta (ração comercial), em sistema de alimentação de três arraçoamentos diários.

2.2 Medidas morfométricas e indução hormonal

Os animais foram pesados e medidos e, além do comprimento padrão, foram realizadas outras três medidas denominadas M1, M2 e M3, com o auxílio de um paquímetro. A medida M1 foi feita na região ventral, posteriormente, as nadadeiras peitorais, a medida M2 foi feita na região ventral entre as nadadeiras peitorais e papila urogenital e a medida M3 na região ventral próxima à papila urogenital. Após a coleta dos dados morfométricos, os animais foram identificados e transferidos para aquários de alvenaria (volume de 2.000L), e mantidos em uma densidade de seis animais/aquário. A água dos aquários foi mantida com sistema de aeração constante e temperatura média de 28°C, controlada com termostato (Figura 1).

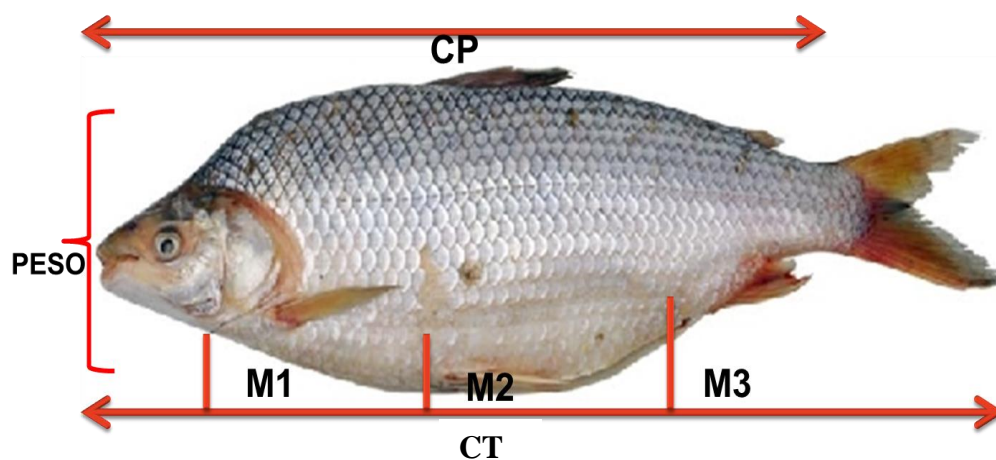


Figura 1 Medidas morfométricas de curimba (*Prochilodus lineatus*) durante período reprodutivo. CP-comprimento padrão; CT-comprimento total; M1-medida 1; M2-medida 2; M3-medida 3

Foram utilizados os dados reprodutivos de 30 fêmeas e 30 machos de curimba a partir do mês de novembro de 2013 até o final da reprodução que ocorreu no início de fevereiro de 2014.

Todos os animais foram submetidos ao tratamento hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), em duas dosagens, para indução da espermição e desova. As doses prévias e definitivas consistiram de injeções intramusculares de 5,0mg de EBHC kg⁻¹ de peso corporal para as fêmeas e 0,4mg de EBHC kg⁻¹ de peso corporal para os machos, próximo à base da nadadeira dorsal. O intervalo entre as aplicações do hormônio foi de 12 horas, e o tempo entre a dose definitiva e a coleta de gametas oscilou entre 6 horas.

Os animais foram escolhidos aleatoriamente em cada coleta, nos meses de novembro e dezembro de 2013 e janeiro e fevereiro de 2014 conforme as condições apresentadas no quadro abaixo:

Coleta	Data da coleta	Pluviosidade (mm ³)	Temp °C (tanque)
01	19/11/2013	01	25,0
02	03/12/2013	27	23,5
03	10/12/2013	00	23,5
04	17/12/2013	00	23,5
05	21/01/2014	05	24,5
06	04/02/2014	00	25,1

Quadro 1 Esquema dos dias de coleta realizada durante o período reprodutivo

Após 6h da dose inicial, a papila urogenital das fêmeas e dos machos foi limpa e seca com toalha de papel para prevenir contaminação e ativação dos gametas com fezes água e urina. A parede celomática foi suavemente massageada no sentido crânio-caudal para promover a liberação dos gametas.

2.3 Parâmetros reprodutivos da fêmea

Para as fêmeas foram analisados os parâmetros reprodutivos: peso da desova (g), número total de oócitos, posição da vesícula germinativa, diâmetro dos oócitos (mm), taxa de fertilização dos oócitos (%).

A desova foi pesada em balança digital e o número total de oócitos foi dado pela contagem do número de oócitos em um grama de desova e multiplicado pelo seu peso total.

A posição da vesícula germinativa foi verificada a partir de oócitos previamente imersos em líquido de Serra (LEMANOVA; SAKUN, 1975), em microscópio estereoscópio binocular. Foram analisados 20 oócitos de cada fêmea. A análise da posição da vesícula germinativa foi descrita como central, periférica, não identificada.

Para a medida do diâmetro dos oócitos, uma alíquota dos mesmos foi imersa em líquido de Gilson (SIMPSON, 1951). Foram medidos 20 oócitos de cada fêmea em microscópio ótico utilizando objetiva micrométrica.

2.4 Parâmetros reprodutivos do macho

Para os machos foram analisados os parâmetros reprodutivos: volume de sêmen (mL), motilidade (segundos), concentração espermática (eptz/mL) e alterações espermáticas (%).

O sêmen foi coletado em tubo de ensaio graduado para medida do volume total espermiado que foi dado em mL. Para análise do tempo de motilidade, uma alíquota de 10 μ L de sêmen *in natura*, de cada animal, foi colocada sobre uma lâmina de vidro e imediatamente homogeneizada com 40 μ L de água. O tempo de motilidade foi observado ao microscópio ótico (aumento 400X). O tempo máximo foi estimado até que restaram, aproximadamente, 10% de espermatozoides móveis.

A concentração espermática foi realizada colocando-se uma alíquota de 10 μ L do sêmen em 990 μ L solução de formol citrato numa diluição de 1:100. A contagem foi feita em câmara de Neubauer utilizando a fórmula:

Número espermatozoides x 5 (número quadrados contados) x 100 (fator diluição) x 10 (altura entre lamínula e câmara) = total espermatozoide

A morfologia dos espermatozoides foi analisada com uma alíquota de sêmen colocada em solução de formalina 10%. A suspensão de espermatozoides foi colocada em uma lâmina de vidro e corada com rosa de Bengala. As lâminas foram observadas ao microscópio ótico (aumento 1000X). Para cada amostra foram analisadas 100 células. As anomalias analisadas foram: cabeça (isolada,

macrocefalia, microcefalia), cauda e peça intermediária (fragmentada, enrolada, isolada).

2.5 Taxa de fertilização

Após a coleta do oócitos e do sêmen, os mesmos foram misturados e, em seguida, adicionou-se água para ativação dos gametas que foi trocada por três vezes consecutivas. Posteriormente à fertilização, os ovos (200g/incubadora) foram colocados em incubadoras do tipo cônicas com capacidade para 200L. Após 8 horas de incubação, foi avaliada a taxa de fertilização por meio de amostragem de ovos retirados da incubadora. Foram contados, aproximadamente, 100 ovos em microscópio estereoscópico binocular e a taxa de fertilização foi dada pela fórmula:

$$TF = \{E/(E + i)\} \times 100 \text{ onde,}$$

E= número de embriões viáveis

i= número de ovos inviáveis

2.6 Coleta de sangue

Cada animal foi retirado do aquário e contido em uma bancada para a coleta do sangue que foi realizada antes da aplicação do EBHC nos dias reprodutivos citados no quadro 1. Para a coleta de sangue foram utilizadas seringas de 3mL com agulhas 25x7mm ambientadas com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Foram coletados 2mL de sangue da veia caudal de cada animal. O sangue foi armazenado a 8°C até o momento da separação do plasma. As amostras foram levadas para o laboratório de análises do Biotério Central da UFLA/Lavras-MG onde o plasma foi separado por

centrifugação a 5000rpm por oito minutos. O plasma ficou armazenado a -80°C até o momento das análises.

2.7 Avaliação da concentração sérica de glicose, cortisol e hormônios reprodutivos

A quantificação da glicose foi realizada com o teste rápido utilizando o sistema Breeze©2 (Bayer Health Care, RJ). Após a coleta do sangue total de cada animal o teste foi realizado colocando uma gota do mesmo no *chip* de detecção. Para a dosagem dos hormônios um ml do sangue foi centrifugado a 1500rpm por oito minutos. O plasma foi separado e armazenado a -80°C até o momento da quantificação dos hormônios.

Os hormônios foram quantificados utilizando ensaio imuno-enzimático (ELISA). Foram quantificados os hormônios testosterona, 17- β -estradiol, progesterona (Enzo Life Sciences) e o cortisol (Diagnostics Biochem Canada Inc) segundo recomendações do fabricante. Para a leitura dos testes foi utilizado leitor de ELISA (Thermo Scientific Multiskan GO, USA) no comprimento de onda 405nm (estradiol, progesterona e testosterona) e 450nm (cortisol) de acordo com as recomendações contidas no manual do aparelho.

2.8 Análise estatística

Para avaliar diferenças nos hormônios sexuais e parâmetros reprodutivos de machos e fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*), ao longo do período de piracema, foram aplicados testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguidos de testes de comparação múltipla de LSD (least significance difference) (MAROCO, 2010). Optou-se pelo teste de Kruskal-Wallis quando não foi

observada distribuição normal dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk ou igualdade de variância pelo teste de Levene.

A relação entre os parâmetros reprodutivos e os hormônios sexuais foi realizada, por meio de testes de correlação de Pearson ou Spearman, este quando não verificada distribuição normal dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. Todas as análises estatísticas foram realizadas, por meio do pacote estatístico SPSS® 20.0, considerando um nível mínimo de confiança de 90% ($p < 0,10$).

3 RESULTADOS

3.1 Resultados referentes aos parâmetros reprodutivos dos machos de curimba (*Prochilodus lineatus*)

Durante o período reprodutivo a temperatura média dos tanques foi de $24,2 \pm 1,8^\circ\text{C}$ e os índices pluviométricos foram de $6,2 \pm 2,8\text{mm}$. O peso médio dos machos foi 1,0 (0,98) kg. O comprimento padrão médio dos machos foi de $36,5 \pm 2,9\text{cm}$. No final do período reprodutivo houve uma diminuição do comprimento padrão dos reprodutores. Ao longo do período reprodutivo, a medida M1 apresentou uma diminuição e sua média foi de $47,15 \pm 4,4\text{cm}$, porém essa diminuição não foi estatisticamente significativa ($p > 0,10$). Essa diminuição em M1 pode estar indicando diminuição do abaulamento celomático. A medida M2 apresentou diferença estatística ($p < 0,10$), ao longo do período reprodutivo e foi caracterizada por uma oscilação entre elas. A medida M3 não apresentou diferença estatística entre os dias de coleta sendo sua média de 35,4 (12,9) cm ($p > 0,10$), (Tabela 1).

Em relação à variação hormonal e bioquímica, durante o período reprodutivo, para o cortisol não foram encontradas diferenças estatísticas ($p > 0,10$). Entretanto a glicose apresentou uma variação em picos, em que as concentrações mais altas foram observadas em semanas alternadas do período reprodutivo ($p < 0,10$), (Tabela 2).

A testosterona apresentou maior concentração plasmática na primeira coleta do período reprodutivo e, posteriormente, atingiu menores valores na quarta e quinta coletas. Embora a concentração de testosterona tenha diminuído depois da 1ª coleta, o número de espermatozoides não apresentou diferença estatística ao longo do período reprodutivo ($p > 0,10$) (Tabela 2). Para as

alterações morfológicas, observou-se diferença estatística entre as coletas com valores oscilando durante o período reprodutivo ($p < 0,10$) (Tabela 2).

O volume de sêmen espermiado, durante o período reprodutivo, teve uma média de 4,1(2,6)mL ($p < 0,10$), (Tabela 2). O volume de sêmen foi maior na quinta coleta e, no início e final do período reprodutivo, apresentou volume menor ($p < 0,10$). Ao longo dos experimentos a motilidade espermática teve uma duração média de 59 ± 12 segundos ($p < 0,10$).

Tabela 1 Parâmetros de peso, comprimento padrão e medidas abdominais M1, M2, M3 de machos de curimba (*Prochilodus lineatus*) durante período reprodutivo ($p < 0,10$)

Parâmetros ¹	Coleta (semana)					
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a
Peso (kg)	0,80(1,38) ^a	0,93(1,11) ^a	0,88 (0,4) ^a	1,1 (1,5) ^a	1,3 (0,71) ^a	1,1 (0,8) ^a
CP (cm)	40,8 \pm 1,5 ^a	37,5 \pm 4,8 ^{a,c}	38,4 \pm 3,6 ^a	38,3 \pm 3,1 ^a	29,1 \pm 2,9 ^b	34,9 \pm 1,2 ^{b,c}
M1 (cm)	56,8 \pm 3,1 ^a	51,6 \pm 6,8 ^a	51,5 \pm 5,6 ^a	50,0 \pm 5,3 ^a	37,3 \pm 3,8 ^b	35,7 \pm 1,5 ^b
M2 (cm)	61,3 \pm 1,8 ^a	56,5 \pm 7,7 ^a	53,6 \pm 4,9 ^a	50,7 \pm 5,9 ^b	39,8 \pm 4,2 ^c	50,1 \pm 1,1 ^b
M3 (cm)	35,3 (1,5) ^a	33,5 (8,2) ^a	35,7 (7,0) ^a	32 (5,0) ^a	27 (7,2) ^a	48,6 (6,3) ^a

¹Mediana (distância interquartílica)/ média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,10$) pelos testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis (este quando não observada distribuição normal nos dados pelo teste de Shapiro-Wilk ou igualdade de variância pelo teste de Levene),

Tabela 2 Parâmetros de cortisol, glicose, testosterona, volume de sêmen, concentração espermática e alterações morfológicas (% sptz normais) de machos de curimba (*Prochilodus lineatus*), coletados durante período reprodutivo ($p < 0,10$)

Parâmetros ¹	Coleta (semana)					
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a
Cortisol (µg/dL)	42,7±11,2 ^a	31,8±21,7 ^a	40,5±6,2 ^a	35,6±6,5 ^a	38,6±3,5 ^a	37,7±1,2 ^a
Glicose (mg/dL)	85,3±16,9 ^c	160,2±55,5 ^a	56,5±8,2 ^d	101,7±26,7 ^{b,c}	48,5±9,3 ^d	104,1±1,6 ^b
Testosterona (pg/dL)	148,3±33,8 ^a	73,7±8,9 ^b	81,8±22,5 ^b	46,6±6,6 ^C	61,8±21,8 ^c	83,2±18,6 ^b
Volume de sêmen (ml)	5,5(2,1) ^b	3,0 (3,2) ^b	4,9(4,8) ^b	6,5(3,9) ^a	1,5 (0,4) ^c	3,3(1,2) ^b
Concentração espermática (x10⁶ /mL)	1,7±0,3 ^a	1,7±0,3 ^a	1,8±0,3 ^a	2,3±0,7 ^a	1,9±0,2 ^a	2,5±0,3 ^a
Alterações morfológicas (% sptz normais)	82,0±2,7 ^c	86,0±3,4 ^b	83,5±7,8 ^b	89,3±1,5 ^{b,c}	88,8±1,7 ^{b,c}	90,0±1,3 ^a

¹Mediana (distância interquartílica)/ média±desvio padrão. Letras diferentes, na linha, indicam diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,10$) pelos testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis (este quando não observada distribuição normal nos dados pelo teste de Shapiro-Wilk ou igualdade de variância pelo teste de Levene).

Considerando os dados de correlação, as medidas M1xM2 ($r=0,829$; $p=0,000$) apresentaram correlação positiva em que quanto maior foi M1 maior foi M2. A medida M3 teve correlação positiva com a medida M2 ($r=0,400$; $p=0,039$). Esses dados demonstram que a gônada cresce de forma homogênea durante o período reprodutivo.

A concentração de espermatozoide apresentou correlação positiva com a concentração de testosterona ($r=0,430$; $p=0,025$) e com o volume de sêmen ($r=0,430$; $p=0,025$). Portanto, quanto maior a concentração plasmática de testosterona maior o volume seminal e maior a concentração de espermatozoide ejaculado (tabela 3).

Os dados de correlação, também, demonstraram que há uma correlação negativa entre o período reprodutivo e a concentração de cortisol ($r=-0,617$; $p=0,001$). Ou seja, com o passar dos dias reprodutivos as concentrações plasmáticas de cortisol diminuiram. O mesmo comportamento foi observado com o volume de sêmen que diminuiu ao longo do período reprodutivo ($r=-0,327$; $p=0,096$), (Tabela 3).

Tabela 3 Coeficientes de correlação dos parâmetros reprodutivos de machos de curimba (*Prochilodus lineatus*) durante o período reprodutivo ($p<0,10$)

Parâmetro	Correlação	Valor de p
M1 x M2 ¹	0,829	0,000
M2 x M3 ¹	0,400	0,039
Concentração espermatozoide x Testosterona ¹	0,430	0,025
Concentração espermatozoide x volume sêmen ¹	0,430	0,025
Período reprodutivo x cortisol ²	-0,617	0,001
Período reprodutivo x volume sêmen ²	-0,327	0,096

M1-largura entre nadadeiras peitorais; M2- largura da região intermediária entre nadadeiras peitorais e papila urogenital; M3- largura na região da papila urogenital.¹Coefficiente de correlação de Pearson. ²Coefficiente de correlação de Spearman.

3.2 Resultados referentes aos parâmetros reprodutivos das fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*)

O peso médio encontrado para as fêmeas foi de 1,41(1,1) kg e não houve diferença estatística entre as coletas ($p>0,10$). O comprimento padrão das fêmeas foi de $38,2\pm 5,4$ cm ($p<0,10$). A medida M3 foi maior no final do período reprodutivo enquanto a medida M1 apresentou diferença estatística entre as coletas, mantendo-se estatisticamente igual até a metade do período reprodutivo e diminuindo no final ($p<0,10$).

Para os parâmetros glicose, cortisol, progesterona, estradiol, peso da desova, número total de oócitos e diâmetro de oócitos e posição da vesícula germinativa não houve diferença estatística ($p>0,10$), (Tabela 5).

A taxa de fertilização apresentou diferença estatística entre as coletas, sendo menores até a metade do período reprodutivo e maiores a partir da metade até o final do período ($p<0,10$) (Tabela 5).

Tabela 4 Parâmetros de peso, comprimento e medidas abdominais de fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*) durante período reprodutivo ($p < 0,10$)

Parâmetro ¹	Coleta (semana)					
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a
Peso (kg)	0,80 (0,8) ^a	2,1 (1,0) ^a	2,2 (1,2) ^a	1,3(1,7) ^a	1,0 (0,9) ^a	1,1 (0,5) ^a
CP (cm)	39,7±8,7 ^a	41,6±5,2 ^a	33,5±2,6 ^a	42,8±3,6 ^a	33,7±7,5 ^a	39,2±4,6 ^a
M1 (cm)	62,3±14,1 ^a	63,7±4,1 ^a	54,7±14,5 ^a	57,8±7,2 ^a	47,8±11,0 ^b	40,5±4,1 ^c
M2 (cm)	67,2±17,7 ^a	78,9±5,8 ^a	65,0±15,2 ^a	66,7±9,7 ^a	53,5±13,8 ^a	61,3±6,5 ^a
M3 (cm)	38,7(14,1) ^b	37,4(8,2) ^b	31,3(5,4) ^b	36,0(11,3) ^b	25 (11) ^c	50,3 (13,5) ^a

¹Mediana (distância interquartilica)/ média±desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,10$) pelos testes de ANOVA ou Kruskal-walis (este quando não observada distribuição normal nos dados pelo teste de Shapiro-wilk ou igualdade de variância pelo teste de Levene).

Tabela 5 Parâmetros de glicose, cortisol, progesterona, estradiol, peso desova, número total de oócitos, diâmetro oócitos, PPVG e TF de fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*) durante período reprodutivo ($p < 0,10$)

Parâmetros ¹	Coleta (semana)					
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a
Glicose (mg/dL)	101,3±23,2	106,8±56,9	69,7±15,1	113,5±27,3	61,6±26,9	80,8±19,3
Cortisol (µg/dL)	45,2±8,9	42,3±6,1	31,5±2,4	34,3±8,6	44,7±10,1	42,2±7,4
Progesterona (µg/dL)	33,5±8,1	29,7±20,4	39,9±3,2	43,2±14,2	39,5±9,9	36,9±10,5
Estradiol (pg/ml)	6255,7 (78)	8814,3(9892)	6001,0(1502)	6315,9(5635)	6954,9(1594)	6867,7(1678)
Peso desova (mg)	182,7±74,1	363,0±9,2	413,3±194,2	315,3±4,3	226,0±94,8	165,3±51,0
Número total oócitos (x10⁵)	2,3±1,1	4,1±1,5	3,9±1,5	3,3±1,7	2,6±1,6	2,2±6,1
Diâmetro oócito (mm)	3,9±0,2	4,5±0,3	4,6±0,3	4,5±0,1	4,5±0,2	4,4±0,1
PPVG (%periférica)	75 (15)	82,5 (65)	75 (28)	57,5(40)	45(40)	67,5(5,0)
TF (%)	12,1 (8,0) ^b	3,9(7,2) ^b	6,2(1,6) ^b	56,7(40,5) ^a	64,0(85,0) ^a	63,7(3,8) ^a

¹Mediana (distância interquartílica)/ média±desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,10$) pelos testes de ANOVA ou Kruskal-walis (este quando não observada distribuição normal nos dados pelo teste de Shapiro-wilk ou igualdade de variância pelo teste de Levene).

As medidas M1 e M2 apresentaram correlação positiva, quando aumenta a medida M1 também aumenta a medida M2 ($r=0,859$; $p=0,000$). A medida M1 também apresentou correlação positiva com a concentração plasmática de glicose ($r=0,520$; $p=0,005$) (Tabela 6).

Tabela 6 Coeficientes de correlação de Pearson para os parâmetros reprodutivos de fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*) durante o período reprodutivo ($p<0,10$)

Parâmetro	Correlação	Valor de p
M1 x glicose	0,520	0,005
M1 x M2	0,859	0,000

M1-largura entre nadadeiras peitorais; M2- largura da região intermediária entre nadadeiras peitorais e papila urogenital.

4 DISCUSSÃO

No período reprodutivo estudado, que compreendeu os meses de novembro de 2013 ao início de fevereiro de 2014, os índices pluviométricos foram baixos tendo uma média de $6,2 \pm 2,8$ mm. Silva (2007) relata em seus achados uma precipitação média de três períodos reprodutivos de 225,92 mm.

A temperatura média da água dos tanques de terra, durante o período reprodutivo, foi $24,2 \pm 1,8$ °C. Porém, após a retirada dos reprodutores do tanque de terra, eles foram para o tanque de alvenaria com temperatura controlada de 28 °C. Silva et al. (2009) citam que a temperatura média indicada para reprodução de curimbas (*Prochilodus lineatus*) é 28 °C, sendo essa adequada para o crescimento gonadossomático e controle do eixo hormonal hipotálamo-hipófise-gônada. Woynarovich e Horváth (1989) assinalam que abaulamento ventral é mais observado em fêmeas, porém essa característica pode ser utilizada também para seleção de machos. Em nossos resultados, pode-se observar uma correlação positiva entre as medidas M1 e M2 e entre as medidas M2 e M3 em machos, demonstrando a presença do abaulamento celomático em todo o comprimento do peixe.

O volume espermático variou de 5,5(2,1) mL no começo do período reprodutivo a até 3,3 (1,2) mL no final do período. A testosterona teve sua maior concentração no início do período reprodutivo, porém o número total de espermatozoides não se alterou ao longo do período reprodutivo. A 11-cetotestosterona (11-KT) induz a produção de ativina pelas células de Sertoli, estimulando a proliferação de espermatogônia (MIURA; MIURA, 2003). Miura et al. (2006) demonstraram que, após 20 dias de cultivo de espermatogônias com estímulo da 11-KT, ocorre sua diferenciação em espermatozoides, indicando que as espermatogônias demoram um tempo para se diferenciarem em espermatozoides, o que explicaria os níveis aumentados de testosterona

plasmática nos machos, no início do período reprodutivo e o aumento na concentração espermática ao longo do período reprodutivo.

Os dados de correlação foram positivos entre a concentração plasmática de testosterona e o volume de sêmen e entre o volume de sêmen e a concentração de espermatozoides. O aumento da concentração plasmática de testosterona desencadeia um *feedback* negativo, determinando assim a variação em picos da testosterona (BABIN; CERDÁ; LUBZENS, 2007).

Segundo Kammerer, Cech e Kultz (2010), a concentração plasmática de cortisol em tilápia, fora de época de reprodução, é em média 50µg/dL. Em nossos experimentos não houve diferença estatística para as concentrações de cortisol em machos ao longo do período reprodutivo e os valores foram próximos do encontrado pelos autores acima citados. Além disso, houve uma correlação negativa entre o cortisol e o período reprodutivo, ou seja, conforme avançava o período reprodutivo ocorria uma diminuição da concentração plasmática de cortisol. O eixo hipotalâmico-hipofisário-interrenal, responsável pelo controle do estresse primário, tem controle direto no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e o cortisol interfere diretamente na reprodução, podendo acelerar, atrasar ou inibir a reprodução (SHAHJAHAN; KITAHASHI; PARHAR, 2014). Conforme o estresse se torna crônico, os níveis de cortisol diminuem (TOKARZ et al., 2015). É possível que a diminuição dos níveis de cortisol, ao longo do período reprodutivo, também, tenha influenciado no aumento do volume de sêmen e na porcentagem de espermatozoides normais.

A concentração plasmática de glicose em machos, também, apresentou uma variação em picos, porém não houve diferença estatística entre as concentrações durante o período reprodutivo. Martinez, Azevedo e Winkaler (2008) descrevem que a concentração plasmática de glicose em curimba, fora do período reprodutivo, é em média 54mg/dL. Simonato (2006), também, descreve uma média de concentração plasmática de glicose de 45mg/dL. Portanto, em

nossos experimentos, ainda que não tenha sido uma diferença estatisticamente significativa, os valores, ao longo do período reprodutivo, foram mais altos do que aqueles encontrados pelos autores citados.

Em fêmeas, apenas a medida M3 apresentou diferença estatística ao longo do período reprodutivo, diminuindo com o passar do tempo. Porém, na última coleta, o abaulamento celomático volta a aumentar. Para M1, a diminuição, com o passar do tempo, também, foi visível e para M2 não houve diferença estatística. Segundo McMillan (2007), conforme os folículos vão incorporando vitelogenina e aumentando de tamanho, eles vão sendo deslocados no interior da gônada. Sendo assim, é provável que o desenvolvimento gonadal comece pela região cranial, representado em nossos experimentos pela medida M1 e termine pela região caudal, representado pela medida M3. Em nossos experimentos, a medida M2 não se altera, pois conforme os folículos crescem e vão se deslocando por meio da gônada, a parte média está sempre aumentada.

Foi demonstrado, em nossos experimentos, que não houve diferença na concentração plasmática de estradiol, progesterona e cortisol. O estradiol é responsável pela vitelogênese, que ocorre durante o processo de desenvolvimento gonadal e que permite a formação e o acúmulo de vitelo no oócitos proporcionando um grande crescimento dos mesmos (SALLUM, 1999). Já os progestágenos têm papel importante na maturação oocitária e desova (FERNANDES et al., 2014). Segundo Tokarz et al. (2015), após a vitelogênese, os níveis de estradiol diminuem e os níveis de progesterona e MIS aumentam, promovendo maturação folicular.

As medidas M1 e M2 têm uma forte correlação positiva demonstrando que a gônada aumenta seu tamanho de maneira equivalente. Além disso, a glicose apresentou correlação positiva com medida M1. Observa-se que a reprodução é afetada pelas reservas energéticas do animal cujos mecanismos neuroendócrinos estão associados a balanço energético (SHAHJAHAN;

KITAHASHI; PARHAR, 2014). Porém, em nossos experimentos, não houve diferença estatística em relação ao cortisol durante o período reprodutivo. Possivelmente, à medida que ocorre desenvolvimento gonadal, também, ocorre um aumento na disponibilidade de energia, na forma de glicose plasmática.

Neste trabalho, demonstra-se que a utilização das medidas M1 e M2 do abaulamento celomático pode ser aplicada para seleção de reprodutores fêmeas e machos. Demonstramos, também, a relação existente entre os parâmetros reprodutivos e o perfil plasmático dos hormônios reprodutivos de machos e fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*) no período reprodutivo.

5 CONCLUSÕES

Os parâmetros morfométricos não são confiáveis para avaliação da maturação gonadal em machos e fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*). Em machos de curimba, a determinação da concentração plasmática de testosterona pode ser utilizada para identificação da qualidade espermática. As quantificações plasmáticas dos hormônios reprodutivos estradiol e progesterona não podem ser utilizadas para identificar a fase de maturação gonadal, pois as fêmeas já estão em vitelogênese completa.

ABSTRACT

The objective in the present study was to determine the coelomic bulging through morphometric measurements M1, M2 and M3 as well as reproductive parameters and hormonal profile in male and female of *Prochilodus lineatus* induced with crude extract of carp pituitary, during the reproductive period. The experiment was conducted in Itutinga experimental station from November 2013 to February 2014. Females were selected through the ventral bulging and hyperemia of the urogenital papilla while males did release semen through a mild abdominal compression. After selecting the breeders were weighed and measured the pattern length, and coelomic measures. The M1, M2 and M3 measurements were made immediately after the weighing with the aid of a caliper rule, where M1 was made on the position of the pectoral fins, M2 between the pectoral fins and urogenital papilla and M3 in the urogenital papilla position. After the measurements, blood was collected through puncture with tube containing EDTA. They were quantified in plasma glucose of each breeder, testosterone, 17- β -estradiol, progesterone, and cortisol. It was found that the abdominal morphometric measurements M1 and M2 do not correlate with reproductive parameters evaluated both for males and females. Testosterone not correlated with the coelomic bulging or the quality of gametes ($p > 0.10$). But along the reproductive period testosterone showed a pattern of concentration peaks, which are probably related to the volume and concentration of sperm. For females there was no change in plasma concentrations of estradiol and progesterone and no correlation between hormones with spawning quality parameters. However, plasma glucose concentration showed a correlation with ventral bulging suggesting a metabolic change to energy maintenance.

Key- words: Reproduction. Estradiol. Hormonal induction. Testosterone

REFERÊNCIAS

BABIN, P. J.; CERDÁ, J.; LUBZENS, E. **The fish oocyte from basic studies**. Dordrecht: Springer, 2007. 483 p.

CLELLAND, E.; PENG, C. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, New York, v. 312, n. 1/2, p. 42-52, Nov. 2009.

FERNANDES, D. et al. The in vitro interference of synthetic progestogens with carp steroidogenic enzymes. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 155, p. 314-321, Oct. 2014.

ISEKI, K. K.; NEGRÃO, J. A. Controle neuroendócrino da reprodução de peixes teleósteos. **Revista de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 1, n. 1, p. 11-22, 2003.

KAMMERER, B. D.; CECH, J.; KULTZ, D. Rapid changes in plasma cortisol, osmolality and respiration in response to salinity stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 157, n. 3, p. 260-265, Nov. 2010.

KUBITZA, F. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. 4. ed. São Paulo: Ed. Jundiaí, 2004. 108 p.

LEMANOVA, N. A.; SAKUM, O. F. Metodisceskoe posibile pogor monalnoistimulacji proizvoditelei Karpa pré rannom polucenii licinok. **Izvestiya Gosudartvennogo Nauchno - Isseledivatel Skogo Instituta**, Abakan, v. 88, p. 3-23, 1975.

LUBZENS, E. et al. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 165, n. 3, p. 367-389, Feb. 2010.

MAROCO, J. **Análise estatística com utilização do SPSS**. 3. ed. Lisboa: Silabo, 2010. 824 p.

MARTINEZ, C. B. R.; AZEVEDO, F.; WINKALER, E. U. Parâmetros bioquímicos de *Prochilodus lineatus* expostos a fração solúvel de gasolina. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 23., 2008, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: FESBE, 2008.

MCMILLAN, D. B. **Fish histology: female reproductive systems**. New York: Springer, 2007. 598 p.

MIURA, T. et al. Progesterone is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 19, p. 7333-7338, 2006.

MIURA, T.; MIURA, C. I. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 181-186, Mar. 2003.

SALLUM, W. B. **Reprodução das principais espécies de peixes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 47 p.

SCHULZ, R. W. et al. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 165, n. 3, p. 390-411, Feb. 2010.

SCOTT, A. P.; SUMPTER, J. P.; STACEY, N. The role of the maturation-inducing steroid 17,20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, n. 1, p. 183-224, Jan. 2010.

SHAHJAHAN, M. D.; KITAHASHI, T.; PARHAR, I. S. Central pathways integrating metabolism and reproduction in teleosts. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 36, n. 1, p. 38-47, 2014.

SILVA, J. M. A. **Características reprodutivas de curimba (*Prochilodus lineatus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SILVA, J. M. A. et al. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 10, n. 3, p. 668-677, 2009.

SIMONATO, J. D. **Biomarcadores funcionais e histológicos associados à exposição do peixe *Prochilodus lineatus* ao óleo diesel**. 2006. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

SIMPSON, A. C. The fecundity of the plaice. **Fishery Investigation**, Davis, v. 5, n. 17, p. 1-27, 1951.

TOKARZ, J. et al. Steroids in teleost fishes: a functional point of view. **Steroids**, Stoneham, v. 103, p. 123-144, Nov. 2015.

WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. **Propagação artificial de peixes de águas tropicais**: manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPQ, 1989. 225 p.

ZHANG, W. et al. Molecular cloning of two isoforms of 11beta-hydroxylase and their expressions in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 165, n. 1, p. 34-41, Jan. 2010.