

**UTILIZAÇÃO DE GONADOTROPINA  
CORIÔNICA EQUÍNA E/OU EXTRATO  
BRUTO DE HIPÓFISE DE CARPA NA  
INDUÇÃO DA REPRODUÇÃO DE CURIMBA  
(*Prochilodus lineatus*)**

**GILMARA JUNQUEIRA MACHADO PEREIRA**

**2006**

**GILMARA JUNQUEIRA MACHADO PEREIRA**

**UTILIZAÇÃO DE GONADOTROPINA CORIÔNICA EQUÍNA E/OU  
EXTRATO BRUTO DE HIPÓFISE DE CARPA NA INDUÇÃO DA  
REPRODUÇÃO DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**  
**Prof. Dr. Luis David Solis Murgas**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**  
**2006**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Pereira, Gilmara Junqueira Machado

Utilização de gonadotropina coriônica equina e/ou extrato bruto de hipófise de carpa na indução da reprodução de curimba (*Prochilodus lineatus*). / Gilmara Junqueira Machado Pereira. -- Lavras : UFLA, 2006.

61 p. : il.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. eCG. 2. EBMC. 3. Reprodução induzida. 4. Desova. 5. Sêmen. 6. Peixes. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-639.375

**GILMARA JUNQUEIRA MACHADO PEREIRA**

**UTILIZAÇÃO DE GONADOTROPINA CORIÔNICA EQUÍNA E/OU  
EXTRATO BRUTO DE HIPÓFISE DE CARPA NA INDUÇÃO DA  
REPRODUÇÃO DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de "Mestre".

**APROVADA em 4 de agosto de 2006**

Prof. Dr. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho - UFV

Prof. Dr. Carlos José Pimenta - UFLA

Profª. Dra. Priscila Vieira Rosa Logato - UFLA

**Prof. Dr. Luis David Solis Murgas  
UFLA  
(Orientador)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL**

*A Deus,*

*pelos dons da sabedoria, fortaleza e*

*pelo seu amor infinito e misericordioso.*

*Aos meus pais Gleiber e Izabel,*

*por tudo que têm feito e sempre fizeram por mim.*

*Ao Fabiano, pelo seu amor e*

*pela paciência nas horas de ansiedade.*

### **OFEREÇO**

Ao meu filho, Nicolas, pela confiança, carinho, compreensão nos momentos de ausência e, principalmente, pelo amor.

### **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Especialmente, ao Prof. Dr. Luis David Solis Murgas, pela orientação, apoio, amizade, carinho, compreensão e confiança durante o nosso convívio.

À Profª. Dra. Priscila Vieira Rosa, pela amizade e confiança.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do Mestrado.

Aos membros da banca de avaliação, Prof. Dr. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho e Prof. Dr. Carlos José Pimenta, pela colaboração neste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos.

À Estação Ambiental de Itutinga da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-CEMIG), na pessoa do Sr. Oscar Moura, que forneceu todo o apoio para a realização das coletas e aos funcionários Gilson e Jailson, pelo auxílio e colaboração.

À empresa Tecnopec, pela doação dos hormônios utilizados neste trabalho.

Ao Laboratório do Departamento de Ciências dos Solos, pelo empréstimo do microscópio no qual foram feitas as análises do material coletado, em especial ao Manuel, pela paciência.

Aos funcionários Willian César Cortez e Marcos Antônio Machado, do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, pelo apoio na realização deste trabalho e, principalmente, pela amizade e carinho.

A todos os amigos, Aléssio Batista Miliorini, Juliana Milan, Daniele de Lima, Ana Luísa Neves Alvarenga e Micaela Guidotti, pelo auxílio durante a realização do experimento.

A minha família, em especial às minhas irmãs, Glenia e Gisele, e aos meus cunhados, André e Juliano, pelo carinho e pela convivência fraterna.

À minha amiga Glycia Ferreira de Rezende pela amizade, carinho e principalmente pela cumplicidade.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, agradeço.

## **BIOGRAFIA**

GILMARA JUNQUEIRA MACHADO PEREIRA, filha de Gleiber Avelar Machado e Izabel Araújo Junqueira Machado, nasceu em Boa Esperança, Minas Gerais.

Concluiu o 1º e 2º grau na Escola Estadual Benjamim Guimarães na cidade de Bom Sucesso.

Cursou um ano de Medicina Veterinária na Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, campus Poços de Caldas.

Em novembro de 1999 nasceu seu filho, Nicolas Toledo Soares Pereira, uma grande alegria em sua vida.

Em dezembro de 2003, obteve o título de Bióloga pelo Centro Universitário de Lavras.

Em março de 2005 iniciou o curso de Mestrado em Ciências Veterinárias no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, tendo defendido dissertação em 4 de agosto de 2006.

## SUMARIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1 Características da curimba ( <i>Prochilodus lineatus</i> Valenciennes, 1836).....	3
2.2 Mecanismo neuroendócrino da reprodução de peixes .....	5
2.2.1 Desenvolvimento ovariano em peixes .....	6
2.2.2 Produção espermática em peixes .....	10
2.3 Reprodução artificial em peixes .....	13
2.3.1 Hormônios utilizados na reprodução artificial de peixes.....	15
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
3.1 Local e período experimental .....	24
3.2 Seleção dos reprodutores .....	24
3.3 Tratamento hormonal.....	25
3.4 Coleta de ovócitos e desova.....	27
3.4.1 Avaliação dos ovócitos.....	27
3.4.2 Peso da desova.....	28
3.5 Coleta de sêmen e avaliação das características seminais .....	29
3.6 Análise estatística .....	30
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
4.1 Avaliação dos ovócitos e da desova.....	32
4.2 Avaliação das características seminais .....	38
4.3 Avaliação da morfologia espermática.....	41
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>53</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Hormônios liberadores de gonadotropinas e esteróides utilizados na indução da reprodução de várias espécies de peixes.....	15
TABELA 2: Utilização de extratos hipofisários de peixes na indução da reprodução de várias espécies de peixes.....	17
TABELA 3: Utilização de gonadotropina coriônica humana (hCG) na indução da reprodução de várias espécies de peixes.....	20
TABELA 4: Diferentes associações de substâncias utilizadas na indução da reprodução de várias espécies de peixes.....	22
TABELA 5: Tratamentos estabelecidos para a indução da desova das fêmeas de curimba ( <i>Prochilodus lineatus</i> ).....	26
TABELA 6: Tratamentos estabelecidos para a indução da espermição dos machos de curimba ( <i>Prochilodus lineatus</i> ).....	26
TABELA 7: Valores médios do peso da desova (g), dos diâmetros médios dos ovócitos antes e após a desova (mm) e do índice gonadossomático – IGS (%).....	32
TABELA 8: Valores médios de volume total (ml), concentração do sêmen ( $\times 10^9$ spt/ml), motilidade (%) e duração da motilidade espermática (segundos) de curimba ( <i>prochilodus lineatus</i> ).....	38

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Maturação do ovócito no ovário de peixe e seu controle hormonal. Adaptado de Havey & Carolsfeld (1993) .....	7
FIGURA 2: Controle hormonal do testículo de peixe e maturação do esperma. Adaptado de Havey & Carolsfeld (1993).....	12
FIGURA 3: Proporções dos núcleos dos ovócitos, antes e após a desova, em função do seu posicionamento, para cada um dos tratamentos testados.....	36
FIGURA 4: Proporções de espermatozóides com anormalidades, para cada tratamento hormonal testado.....	42

## RESUMO

PEREIRA, Gilmara Junqueira Machado. **Utilização de gonadotropina coriônica eqüina e/ou extrato bruto de hipófise de carpa na indução da reprodução de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

O estudo avaliou os efeitos da utilização da gonadotropina coriônica eqüina (eCG) e do extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) combinados ou não, na indução da reprodução de machos e fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*). Foram testados 4 tratamentos hormonais diferentes com duas doses intervaladas em 12 horas (A: EBHC 0,5 mg/kg e EBHC 5,0 mg/kg; B: EBHC 0,5 mg/kg e EBHC 5,0 mg/kg + eCG 500 UI/kg; C: EBHC 0,5 mg/kg e eCG 500 UI/kg; D: eCG 500 UI/kg e eCG 500 UI/kg), tendo nas fêmeas sido testados apenas os primeiros 3 tratamentos. Nos machos os parâmetros seminais avaliados foram o volume do sêmen, a motilidade espermática, a duração da motilidade, concentração de espermatozóides e a morfologia espermática. Nas fêmeas, amostras de ovócitos foram coletadas 5 horas e 8 horas após a 2ª aplicação hormonal, para analisar a posição da vesícula germinativa (núcleo) e o diâmetro dos ovócitos. Outro parâmetro avaliado foi o peso da desova das fêmeas induzidas. Para as fêmeas, não houve diferença significativa entre o peso da desova das fêmeas induzidas pelos tratamentos A e B. As fêmeas induzidas pelo tratamento C não desovaram. Na avaliação do diâmetro dos ovócitos, não houve diferença significativa entre os tratamentos, às 5 horas após a 2ª aplicação hormonal, enquanto que, às 8 horas após a 2ª aplicação hormonal, os tratamentos B e C foram diferentes estatisticamente ( $P < 0,05$ ) ao tratamento A. Na avaliação do posicionamento da vesícula germinativa, os tratamentos A e B foram diferentes estatisticamente do tratamento C, tanto às 5 horas quanto às 8 horas após a 2ª aplicação hormonal. Para os machos, os resultados não apresentaram diferença significativa entre os protocolos hormonais utilizados, com relação ao volume do sêmen, à motilidade espermática, à duração da motilidade, e à concentração de espermatozóides ( $P > 0,05$ ). O tratamento no qual utilizaram-se duas doses de 500 UI/kg de eCG, foi diferente estatisticamente dos demais tratamentos, apresentando um menor número de espermatozóides com anormalidades. Pôde-se concluir que o eCG não se mostrou eficiente quando não

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Luis David Solis Murgas - UFLA (Orientador), Priscila Vieira Rosa Logato – UFLA (co-Orientadora).

combinado com o EBHC na segunda aplicação hormonal, na indução da desova de fêmeas de curimba. Contudo, para os machos, o eCG, na dosagem de 500 UI/kg em duas doses, pode substituir o EBHC, na dosagem de 0,5 e 5,0 mg/kg, sem alterar as características seminais avaliadas.

## ABSTRACT

PEREIRA, Gilmara Junqueira Machado. **Utilization of equine chorionic gonadotropin and/or carp pituitary extract in the induction of the reproduction of curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 61 p. Dissertation (Master in Veterinary Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

The present study evaluated the effect of the utilization of eCG (equine chorionic gonadotropin) and of the CPE (carp pituitary extract) combined or not, used in the induction of reproduction of males and females of curimba (*Prochilodus lineatus*). Four different hormonal treatments have been tested, with two doses with interval of 12 h (A: 0,5 CPE mg/kg and 5,0 CPE mg/kg; B: 0,5 CPE mg/kg and 5,0 CPE mg/kg + 500 eCG IU/kg; C: 0,5 CPE mg/kg and 500 eCG IU/kg; D: 500 eCG IU/kg and 500 eCG IU/kg). In the females only the three first treatments have been tested. In the males the evaluated seminal parameters were, volume of the semen, sperm motility, motility duration, spermatozoa concentration and sperm morphology. In the females, samples of oocytes had been collected, five and eight hours after second hormonal application, to analyze the position of the germinative vesicle (nucleus) and the oocytes diameter. Another evaluated parameter was the weight of the spawning on the induced females. For the females, it did not have significant difference on the weight of the spawning of the induced females for the treatments A and the B. The induced females for treatment C had not spawned. In the evaluation of the oocytes diameter, it did not have significant difference on the treatments five hours after the second hormonal application, whereas, eight hours after the second hormonal application treatments B and C had been significant different ( $P < 0,05$ ) to the treatment A. In the evaluation of the positioning of the germinative vesicle, the treatments A and B had been significant different of treatment C, five hours as much as eight hours after the second hormonal application. For the males, the results had not presented significant difference between the used hormonal protocols, with regard to the volume of the semen, sperm motility, motility duration and spermatozoa concentration ( $P < 0,05$ ). The treatment which used two doses of 500 IU/kg of eCG, was significant different of the others treatment, presenting a lower number of spermatozoa with abnormality. It can be concluded that eCG did not reveal efficient when not combined with the CPE in the second hormonal application, in the induction of

---

<sup>1</sup> Guidance Committee: Prof. Dr. Luis David Solis Murgas - UFLA (Major Professor), Priscila Vieira Rosa Logato – UFLA.

the spawning of females of curimba, however for the males, eCG (500 and 500 IU/kg) can substitute the CPE (0,5 and 5,0 mg/kg) without modifying the evaluated seminal characteristics.

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se observado uma intensificação do estudo da ictiofauna brasileira, que revelou várias espécies promissoras para a criação em pisciculturas, como a curimba (*Prochilodus lineatus*), a qual apresenta alta prolificidade, crescimento rápido, elevada rusticidade e é fonte de alimento para as espécies de peixes predadores, o que a torna propícia para o cultivo.

A curimba, como a maioria das espécies de peixes tropicais de água doce, realiza migração em massa, rio acima, na época de reprodução, entre os meses de novembro a janeiro. É interessante, para estas espécies de peixes, desenvolver sua reprodução em período favorável, em termos de disponibilidade de alimento e temperatura, para que a prole tenha melhores condições de crescimento e sobrevivência.

O deslocamento de centenas de quilômetros, durante a migração, afeta toda a fisiologia desses peixes, desencadeando processos essenciais para o preparo da reprodução. Nos viveiros de piscicultura, a privação desse comportamento migratório impede que esses peixes atinjam o preparo fisiológico para a reprodução. Com isso, se faz necessária a indução hormonal da reprodução.

As técnicas de reprodução artificial consistem na indução hormonal da desova e da espermiação, para que os peixes completem seu ciclo reprodutivo no momento desejado e em condições controladas. A padronização das técnicas de indução da reprodução em peixes nativos constitui um problema para os pesquisadores na atualidade. Há vários detalhes importantes no processo, como a determinação do estado de maturação no momento da indução, a hora de aplicação do hormônio, o tipo de hormônio utilizado, o intervalo entre as

aplicações, o período de latência, a variação estacional, as condições ambientais e as técnicas de manipulação dos reprodutores.

A utilização do extrato bruto de hipófise de carpa é, seguramente, o método de indução artificial da reprodução de espécies de caráter reofilico mais utilizado nas estações de piscicultura. Existem vários outros tipos de substâncias utilizadas para induzir a reprodução em peixes, dentre estas, as gonadotropinas de mamíferos vêm se destacando em diversas pesquisas.

Dessa forma, é necessário o aprimoramento das técnicas de indução da reprodução em espécies reofilicas, como a curimba, a fim de suprir as necessidades que a espécie exige na obtenção de maior número de larvas e alevinos de boa qualidade, para uma melhor utilização da espécie no manejo da piscicultura.

O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da gonadotropina coriônica equína (eCG) e do extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) combinados ou não, utilizados na indução da reprodução de machos e fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*). Avaliando os seguintes parâmetros:

- fêmeas: peso da desova, diâmetro dos ovócitos e migração da vesícula germinativa (núcleo);

- machos: volume seminal, motilidade e duração da motilidade espermática, concentração de espermatozóides e morfologia espermática.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características da curimba (*Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836)

A curimba, 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 et al., 2003). Esta espécie era identificada, na bacia do alto rio Paraná, como *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. Castro & Vari (2003) consideraram esta espécie sinônimo de *Prochilodus lineatus*.

Trata-se de uma espécie de peixe de médio porte, atingindo até 70 cm, possui corpo comprimido e alto, e a cabeça larga. As nadadeiras anal, ventrais, caudal e adiposa são escamadas na base e são cinza-amareladas, sem manchas, no adulto. De cor cinza-esverdeada, o corpo é mais escuro no dorso, aclarando-se no ventre, que é prateado. As escamas são ásperas na borda exposta e a linha lateral completa. Possuem um espinho curto e dirigido à frente, na origem da nadadeira dorsal (CEMIG/CETEC, 2000).

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

A curimba é uma espécie que realiza migração em massa, rio acima, na época de reprodução, de novembro a janeiro, podendo migrar várias centenas de quilômetros, até as áreas de desova. O macho se reproduz aos dois anos de

idade, com 24 cm e a fêmea, aos três anos, com 31cm de comprimento. Por se tratar de uma espécie reofilica, não se reproduz em ambientes lênticos e em cativeiro, devendo-se, para tanto, recorrer à hipofização (CEMIG/CETEC, 2000).

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

A espécie é muito importante para a pesca comercial, artesanal ou de subsistência, principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, apesar da carne apresentar sabor não muito delicado (Reis et al., 2003). Pode ser utilizada para a obtenção de farinha de peixe, azeite para cosméticos e para curtir couros.

De acordo com o IBAMA/MMA (Brasil, 2005), o cultivo de *Prochilodus sp.* atingiu 2.385 toneladas da produção brasileira da aquicultura continental, a qual participa com 26,5% na produção total de pescado do Brasil, que alcançou um volume de 1.015.914 toneladas, em 2004. A curimba é uma espécie muito capturada pela pesca extrativista nas águas continentais, superando espécies como a tilápia (*Oreochromis niloticu*) e a traíra (*Hoplias malabaricus*), e se destaca entre as principais espécies de peixes utilizadas na aquiculutra continental brasileira, juntamente com a tilápia, carpa (*Cyprinus carpio*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*).

## 2.2 Mecanismo neuroendócrino da reprodução de peixes

O ciclo reprodutivo dos peixes obedece a uma cronologia que se repete todos os anos, o que evidencia que esses vertebrados sofrem marcante influência sazonal no processo de maturação das gônadas e na sua reprodução. Os estímulos ambientais, como temperatura e fotoperíodo, são captados pelos mais diversificados e apurados órgãos sensoriais dos peixes e todo o processo fisiológico e hormonal envolvido na regulação da formação e maturação dos gametas, na ovulação e na desova (Woyнарovich & Horbáth, 1989).

O sistema nervoso e o sistema endócrino atuam em conjunto para coordenar a reprodução por meio de três grupos de diferentes hormônios, produzidos por órgãos localizados ao longo do eixo: hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Hafez, 2004).

Em peixes teleósteos, 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, por meio da liberação do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) e dopamina, os quais são de grande importância prática na reprodução induzida em peixes.

As gonadotropinas (GTH) são hormônios glicoprotéicos que estão diretamente envolvidos no processo de produção de gametas pelas gônadas. Em diversas espécies de peixes, foram identificados dois tipos de GTH hipofisárias, conhecidas como GTH I e GTH II (Havey & Carolsfeld, 1993). A síntese e a liberação de gonadotropinas pela hipófise são estimuladas pelo GnRH e inibida pela dopamina. As gonadotropinas hipofisárias são transportadas via plasma até as gônadas, onde irão estimular a gametogênese (produção de espermatozóides e

ovócitos) e a esteroidogênese (esteróides sexuais), pelos testículos e ovário. Esteróides sexuais e outros fatores gonadais exercem um controle de feedback positivo e negativo no hipotálamo, na hipófise e na própria gônada (Sallum, 1999).

O conhecimento de todo o mecanismo endócrino, aliado ao do ciclo reprodutivo, incluindo-se a curva de maturação que varia de espécie a espécie, bem como o acompanhamento das variações dos níveis de gonadotropina e esteróides no sangue, poderá proporcionar, por meio de ensaios baseados na dose-resposta, informações sobre o tipo e a dose hormonal necessários para a completa maturação e a ovulação ou espermição dos peixes (Havey & Carolsfeld, 1993).

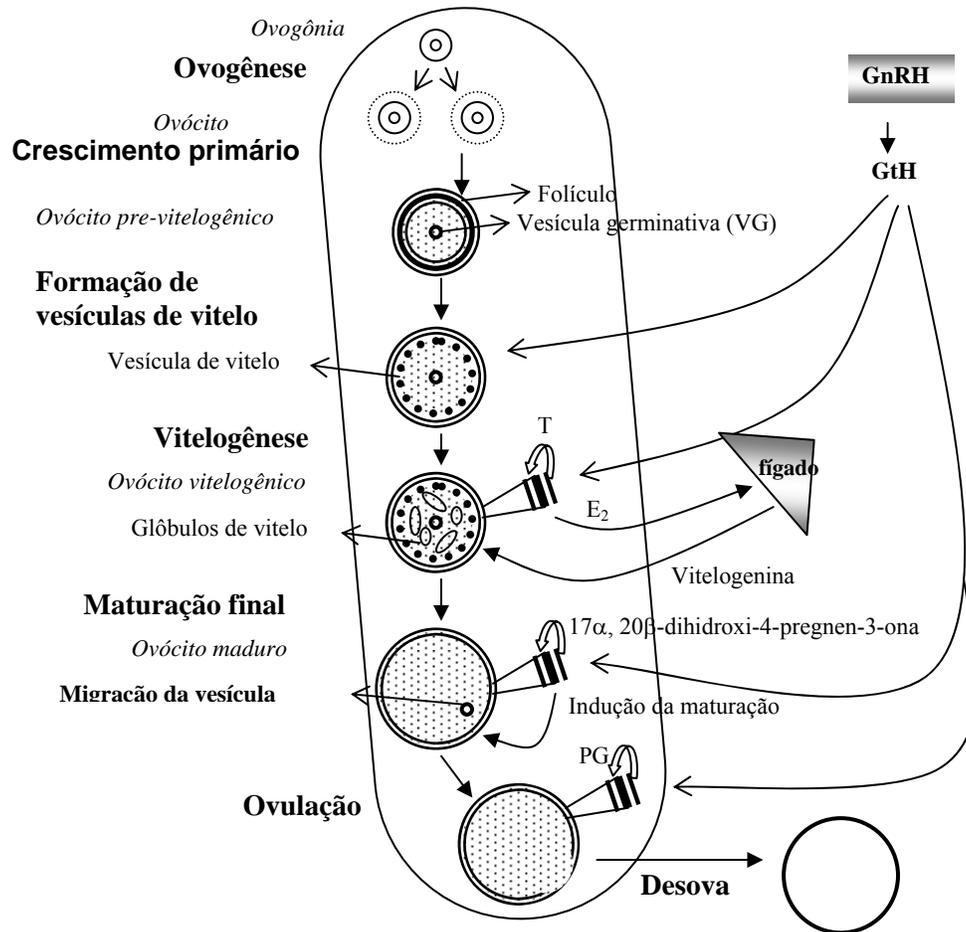
### **2.2.1 Desenvolvimento ovariano em peixes**

O sistema reprodutivo das fêmeas tende a mostrar variações marcantes, refletindo a natureza diversa das estratégias reprodutivas adotadas. Como em outros vertebrados, os ovários, em peixes, são emparelhados e alongados posicionados dorso-lateralmente no forro da cavidade peritoneal, ventralmente à bexiga natatória (Baldisserotto, 2002).

O desenvolvimento ovariano é subdividido em estágios de desenvolvimento distintos, de acordo com critérios fisiológicos, bioquímicos, morfológicos e histológicos (Figura 1). Segundo Coward et al. (2002), as principais fases de desenvolvimento ovariano são classificadas em: proliferação ovogonial, ovogênese, crescimento preliminar e foliculogênese, estágio cortical do alveolo, vitelogênese, maturação e ovulação.

Os ovários são constituídos de células germinais, ovogônias e ovócitos. As ovogônias são as células pequenas e arredondadas que dão origem aos

ovócitos por meio da meiose e estão localizadas na parede do ovário (Sallum, 1999).



**FIGURA 1:** Maturação do ovócito no ovário de peixe e seu controle hormonal. Adaptado de Havey & Carolsfeld (1993).

O desenvolvimento de folículos é um processo muito importante na fase de crescimento dos ovócitos. Nesta fase, não há a influência das gonadotropinas, sendo este crescimento resultante, principalmente, da proliferação dos componentes celulares. Os folículos ovarianos formam-se a partir do momento em que a célula germinal é circundada por uma camada de células foliculares. Estas células se desenvolvem e formam uma camada de células granulosas. Ao mesmo tempo, as camadas externas de tecido conjuntivo formam uma camada de células tecais, entretecidas com capilares sangüíneos. Ambas as camadas são separadas por uma membrana basal (Baldisserotto, 2002).

A membrana granulosa e o próprio ovócito produzem o corion, ou casca de ovócito, que apresenta muitos poros, através dos quais o ovócito e a granulosa mantêm conexão celular por microprolongamentos (Woynarovich & Horbáth, 1989). O corion, no final de seu desenvolvimento, é semipermeável.

A existência de picos de gonadotropina sangüínea, em resposta aos estímulos ambientais, induz o aparecimento das vesículas de vitelo no citoplasma do ovócito, processo este chamado de vitelogênese. Nesse processo ocorrem a formação e o acúmulo de vitelo no ovócito, causando grande crescimento do ovócito. O vitelo é composto por lipídios e proteínas, que será utilizado pelo embrião desde a fecundação até o momento em que for capaz de capturar alimento exógeno (Harvey & Carolsfeld, 1993; Sallum, 1999; Baldisserotto, 2002).

Na vitelogênese está envolvida a indução das células tecais, pelo hormônio folículo estimulante, presente em altos níveis no sangue, para a produção da testosterona, que é convertida ao estrogênio ( $17\beta$  estradiol), nas células da granulosa. A presença do  $17\beta$  estradiol no fígado estimula a produção de vitelogenina. A vitelogenina sintetizada é transportada através do sangue até o folículo e levada ao ovócito, onde é transformada em vitelo (Castagnolli &

Cyrino, 1986; Woynarovich & Horbáth, 1989; Yaron, 1995; Coward et al., 2002; Kubitz, 2004). Quando o conteúdo do vitelo nos ovócitos atinge a quantidade típica da espécie de peixe, a síntese da vitelogenina cessa.

A maturação final, a ovulação e a desova são fases do desenvolvimento que acontecem rapidamente, levando somente algumas horas ou dias. Na natureza, a maturação final inicia-se com alterações ambientais, enquanto que, em cativeiro, a maturação final só ocorre em circunstâncias adequadas para a propagação e sob regulação hormonal (Woynarovich & Horbáth, 1989). A maturação final do ovócito começa com a migração do núcleo na direção da micrópila e sua quebra ou desaparecimento. Nesta fase, ocorrem modificações hormonais, sendo o hormônio luteinizante (LH) secretado em grandes quantidades, em detrimento da redução do hormônio folículo estimulante (FSH).

Em resposta ao LH, o folículo produz o esteróide indutor da maturação que, na maioria das espécies, é uma forma de progesterona chamada  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona. Este esteróide é o reponsável pela migração nucleolar e seu desaparecimento, e pela hidratação do citoplasma do ovócito, com conseqüente aumento do seu diâmetro, tornando o abdômen da fêmea bastante flácido e abaulado (Sallum, 1999).

A ovulação é caracterizada pelo rompimento do folículo, liberando os ovócitos na cavidade do ovário, sob o controle do hormônio prostaglandina e ou por outro composto liberado pelo folículo por estímulo do esteróide indutor da maturação e participação do LH (Coward et al., 2002). A desova acontece quando a fêmea, na presença do macho ou por compressão abdominal, libera os ovócitos, com a finalidade de serem fertilizados pelos espermatozóides.

Uma diferença estrutural principal entre ovócitos de mamíferos e ovócitos dos teleósteos é a presença da micrópila no ovócito. Os espermatozóides dos teleósteos não possuem acrossoma e, conseqüentemente,

penetram no ovócito através de uma abertura pequena na membrana, a micrópila (Coward et al., 2002). O tamanho da micrópila é espécie-dependente, mas geralmente, permite a entrada de somente um espermatozóide. Esta adaptação é crucial na prevenção de polispermia.

Segundo Baldisserotto (2002) caso o ovócito não seja liberado na desova, ele degenera (sofre atresia), sendo fagocitado pelas células da granulosa. O número de ovócitos que sofre atresia pode aumentar se a fêmea não for colocada em condições ótimas para a reprodução. Além disso, o estresse causado pela manipulação do reprodutor no manejo da reprodução também pode levar à atresia. Em condições naturais, a atresia é muito reduzida, e sua ocorrência parece estar relacionada ao estresse da fêmea. Contudo, os estudos realizados até o momento abordam apenas a atresia nos ovócitos que estão nos últimos estágios de desenvolvimento.

### **2.2.2 Produção espermática em peixes**

Os peixes teleósteos possuem um par de testículos alongados que se encontram fixados 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 (Baldisserotto, 2002).

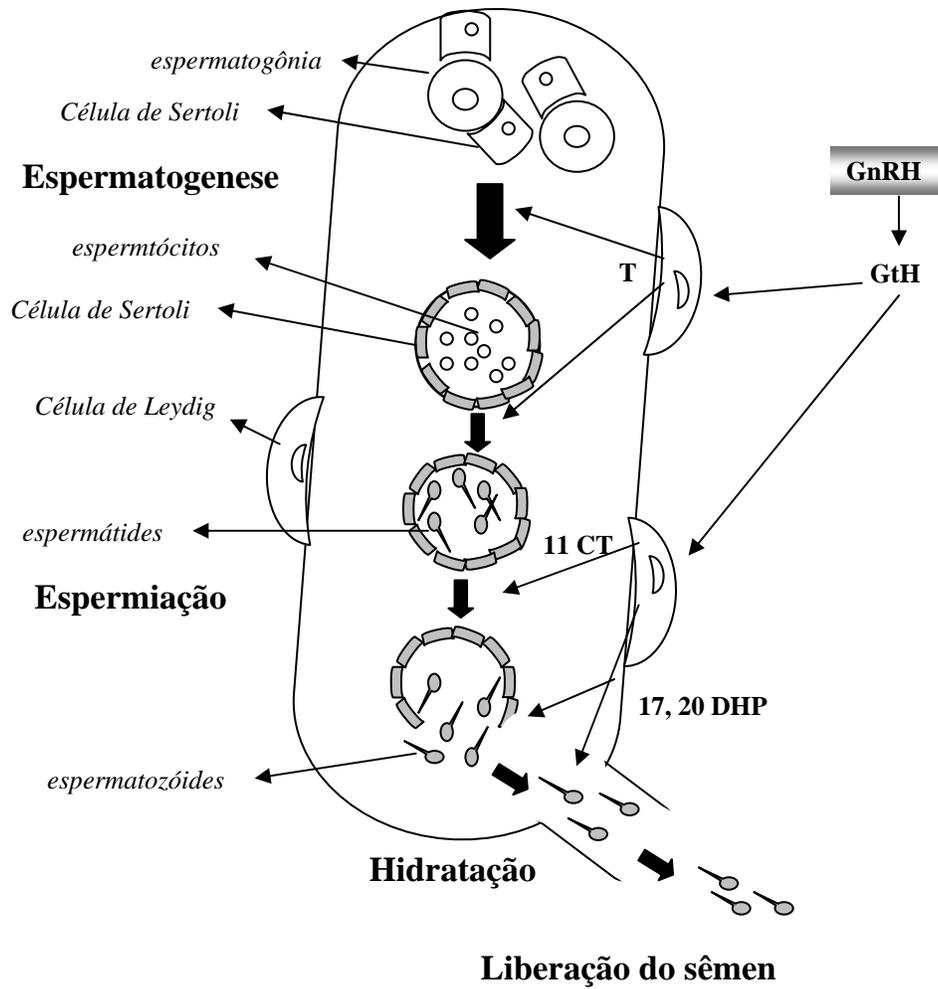
A estrutura testicular dos teleósteos é variável, mas, essencialmente, dois tipos distintos, lobular ou tubular, são evidentes (Coward et al., 2002). Os testículos do tipo lobular são mais comuns em teleósteos e consistem de numerosos lóbulos separados por uma camada de tecido conjuntivo. Cada lóbulo possui vários cistos e, em cada um deles, as células germinais (espermatogônias) apresentam-se no mesmo estágio de desenvolvimento. Nos testículos do tipo tubular, as células que estão nas fases iniciais da espermatogênese são

encontradas junto ao fundo cego dos túbulos e, à medida que vão se desenvolvendo, migram em direção ao ducto espermático.

Os testículos dos teleósteos, como o dos mamíferos, também possuem as células de Sertoli, cuja função é a nutrição das células germinais e as células de Leydig, que têm como função a produção de esteróides que estimulam a gametogênese (Figura 2) e o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários (Coward et al., 2002; Baldisserotto, 2002; Hafez, 2004).

O LH induz as células de Leydig a produzirem testosterona, a qual, associada com FSH, estimulam a espermatogônia a dividir-se em espermatócito. O processo de desenvolvimento de espermatócitos em espermátides é denominado espermiogênese. As células de Leydig, sob indução do LH, produzem o 11-cetotestosterona, que é responsável pelo início do processo da liberação dos espermatozóides no lúmen do testículo, pelo processo conhecido como espermição. O último passo antes da liberação do espermatozóide é a diluição (hidratação) com o fluido seminal das paredes do ducto espermático (Sallum, 1999).

Geralmente, os espermatozóides de peixes são imóveis dentro dos testículos e sua mobilidade inicia-se quando são expostos ao ambiente aquático ou no trato reprodutivo da fêmea (Coward et al., 2002). A ativação do espermatozóide ocorre quando fatores químicos são alterados, em peixes de água doce, a ativação do espermatozóide ocorre quando a osmolaridade da água é menor que a do seu plasma, uma vez que o espermatozóide é liberado na água doce para fecundar os ovócitos (Baldisserotto, 2002).



**FIGURA 2:** Controle hormonal do testículo de peixe e maturação do esperma.

Adaptado de Havey & Carolsfeld (1993).

### 2.3 Reprodução artificial em peixes

A reprodução da maioria dos peixes é sazonal, estando, geralmente, sincronizada com fatores ambientais que se adaptam às necessidades metabólicas dos reprodutores, de tal forma que incremente a viabilidade dos gametas e favoreça o desenvolvimento inicial da prole (Vazzoler, 1996).

A reprodução artificial em peixes iniciou-se em 1934, pelo pesquisador brasileiro Rodolpho von Ihering, que conseguiu êxito na indução da desova e fertilização da curimatá (*Prochilodus scrofa*), uma espécie de caráter reofílico, por meio da aplicação de extratos hipofisários, técnica esta conhecida como hipofisação. No princípio da década de 1980, a Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco, a CODEVASF, importou, da Hungria, um pacote tecnológico sobre reprodução artificial de peixes por meio da hipofisação. A partir daí, esta tecnologia foi difundida com êxito, sendo utilizada nas espécies brasileiras por diversos órgãos governamentais, centros de pesquisas e, principalmente, por piscicultores (Sallum, 1999).

As técnicas de reprodução artificial de peixes são múltiplas, todas elas com o objetivo de produzir quantidade abundante de ovos, larvas e alevinos para a utilização em cultura ou para o repovoamento de lagos e cursos de água. Dependendo da eficiência do sistema de reprodução artificial, o aproveitamento dos ovos até alevinos pode atingir de 10% a 70% no rendimento; em contrapartida, a taxa de sobrevivência sob condições naturais, geralmente, é muito inferior a 1% dos ovos produzidos (Woynarovich & Horbáth, 1989).

Atualmente, a técnica mais comumente usada para a propagação artificial de peixes é a hipofisação. Este é, seguramente, o método de indução artificial da reprodução de espécies de caráter reofílico mais utilizado nas estações de piscicultura, inclusive entre os piscicultores. Conforme o protocolo a

ser adotado para a hipofisacão em espécies de peixes, são efetuadas duas aplicações de solução hormonal nas fêmeas e uma nos machos. No momento da ovulação, o manuseio é realizado visando a retirada dos óvulos (extrusão) e do esperma (espermiacão), com massagens ventrais no sentido crânio-caudal (Harvey & Carolsfeld, 1993).

Para cada espécie, determina-se o momento da extrusão pro meio das horas-graus (HG), considerando-se a temperatura da água e o tempo até a ocorrência da desova, tomada a cada hora, a partir da segunda aplicação hormonal (Godinho & Godinho, 2003). Os valores de HG à extrusão dos ovócitos para cada espécie variam conforme a temperatura da água: assim, quando maior a temperatura, menor o tempo necessário à extrusão. Segundo Sato et al. (2003), pode-se considerar que, definido o valor da HG necessárias à extrusão dos ovócitos de uma determinada espécie, estará praticamente estabelecido esse valor para outras espécies do mesmo gênero ou família. As horas-grau para extrusão da curimba, segundo Silva (2000), são de 308, à temperatura da água de 25°C.

Segundo Woynarovich & Horbáth (1989), o processo de indução artificial praticado nas estações de piscicultura ou entre os piscicultores inicia-se com a seleção minuciosa dos reprodutores aptos, sendo observados, nas fêmeas, o volume e a flacidez ventral, bem como o tamanho e a coloração avermelhada da papila urogenital. Nos machos, a seleção é feita exercendo-se leve pressão abdominal no sentido crânio-caudal, observando-se a existência da espermiacão. Em algumas espécies, não é possível a visualização dessas características.

### 2.3.1 Hormônios utilizados na reprodução artificial de peixes

Existem vários tipos de substâncias utilizadas para induzir a desova e a espermiacão em peixes. Conforme sua estrutura química, agem segundo princípios diferentes. Além disso, a dose necessária de uma mesma substância varia de espécie para espécie, podendo, inclusive, ter efeito em algumas e em outras não. Na Tabela 1 estão apresentadas algumas substâncias que podem ser utilizadas na indução da desova e espermiacão de algumas espécies de peixes.

**TABELA 1:** Hormônios liberadores de gonadotropinas e esteróides utilizados na indução da reprodução de várias espécies de peixes.

Substâncias	Hormônios	Dosagem	Espécies	Referência
Liberadores de gonadotrofinas	GnRH a	50µg	<i>A. ruthenus</i> L.	Rzenieniechi et al., 2004
		25 e 50µg	<i>O. mykiss</i>	Arabaci et al., 2004
	mGnRH a	20 µg	<i>C. nasus</i>	Szabó et al., 2002
		30 µg	<i>B. bidyanus</i>	Levavi-Sivan et al., 2004
	sGnRH a	5, 10, 20, 40µg	<i>O. bonariensis</i>	Miranda et al., 2005
			<i>B. bidyanus</i>	Levavi-Sivan et al., 2004
			<i>O. bonariensis</i>	Miranda et al., 2005
LHRH a	10,20, 30, 40µg	<i>T. ocellatus</i>	Chen, 2005	
		1,25; 2,5; 5; 10µg	<i>O. bonariensis</i>	Miranda et al., 2005
Esteróides	17, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one	10,20, 40, 50µg	<i>T. ocellatus</i>	Chen, 2005
		0,01; 0,02; ...µg	<i>Silurus asotus</i>	Wen & Lin, 2004
		2 mg/kg	<i>Anguilla anguilla</i>	Palstra et al., 2005

O hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) é altamente eficiente na indução da maturação do gametas, da ovulação e da espermiacão em peixes (Harvey & Carolsfeld, 1993). Por isso, atualmente, muitas pesquisas têm se voltado para a utilização do GnRH-a (análogo do GnRH), do mGnRH-a (análogo do GnRH de mamífero) e do sGnRH-a (análogo do GnRH de salmão). Existe, no mercado, LHRH-a (análogo do LHRH de peixe), sintetizado com base na composição do LHRH de salmão. Este hormônio sintético é um liberador de gonadotropina dos peixes e que pode se usado na indução da maturação final e da ovulação, pois estimula a produção e a secreção de gonadotropinas do próprio animal (Kubitza, 2004). Em 1988, Curi & Tsukamoto testaram o LHRH na reprodução induzida do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e obtiveram uma resposta positiva à ovulação em 61,7% das fêmeas.

Os esteróides também têm apresentado bons resultados na indução da espermiacão. Estes, por sua vez, estimulam o final da maturação dos ovócitos e, se o peixe estiver próximo do final da maturação, a ovulação pode ocorrer (Baldisserotto, 2002).

O extrato de hipófise de peixe é o indutor gonadal mais utilizado em todo o mundo e é muito pesquisado na maioria das espécies reofílicas brasileiras, em fêmeas e machos (Tabela 2). Para o preparo deste extrato, são usadas hipófises de peixes doadores, coletadas frescas ou preservadas. Segundo Woynarovich & Horbáth (1989), na hipófise, existem não apenas as gonadotropinas, mas também diversas outras substâncias. Por isso, os peixes doadores devem estar em época de desova ou espermiacão, para que se extraiam as hipófises, pois, nesta época, a quantidade de gonadotropinas é mais alta.

Normalmente, utilizam-se duas injeções intramusculares na fêmea, com intervalo de 4 a 12 horas dependendo da espécie. A primeira dose, preparatória, para a maturação total e a segunda, dez vezes maior que a primeira, para a

ovulação e liberação dos ovócitos. Os machos recebem apenas uma dose de hormônio, na época em que as fêmeas recebem a última dose (Woynarovich & Horvath, 1989; Murgas et al., 2003), mas, em alguns casos, são necessárias duas doses.

**TABELA 2:** Utilização de extratos hipofisários na indução da reprodução de várias espécies de peixes.

Substâncias	Hormônios	Dosagem (mg/kg)	Espécies	Referência
		0,5 e 5,0	Várias	Woynarovich & Horváth, 1989
			<i>B. insignis</i>	Andrade-Talmelli et al., 2002
			<i>O. bonariensis</i>	Leonardo et al., 2004
	Extrato hipofisário de carpa	5, 10, 20, 30, 40	<i>A. anguilla</i>	Miranda et al., 2005
		3; 0,5; 5	<i>C. carpio</i>	Souza et al., 2003
Gonadotrofinas		20	<i>A. anguilla</i>	Palstra et al., 2005
		6, 1, 5	<i>T. ocellatus</i>	Chen, 2005
		3, 6	<i>C. nasus</i>	Szabó et al., 2002
	Extrato hipofisário de frango	5, 1, 9	<i>P. lineatus</i>	Streit Jr et al., 2004 e 2003
			<i>L. macrocephalus</i>	Souza et al., 2003
			<i>C. carpio</i>	Souza et al., 2003
	Extrato hipofisário de coelho	7; 1,4; 12,6	<i>P. lineatus</i>	Streit Jr et al., 2004 e 2003
			<i>L. macrocephalus</i>	Souza et al., 2003
			<i>C. carpio</i>	Souza et al., 2003
	Extrato hipofisário de salmão	5, 10, 20, 30, 40	<i>A. anguilla</i>	Miranda et al., 2005
		4	<i>H. bidorsalis</i>	Adebayo & Fagbenro, 2004.

Em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), dourado (*Salminus brasilienses*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), piapara (*Leporinus elongatus e Leporinus obtusindes*) e curimba (*Prochilodus lineatus*), doses de 0,5 e 5 mg/kg de EBHC foram suficientes para induzir a desova e a espermiacão (Murgas et al., 2003). Por outro lado, as doses de 1 a 6 mg/kg de EBHC foram suficientes para induzir a desova e a espermiacão, com uma porcentagem de sucesso variando entre 60% a 90%, em pacu, tambaqui (*Colossoma macropomum*), matrinxã (*Brycon cephalus*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), dourado (*Salminus brasilienses*), jaú (*Paulicea luetkeni*), curimatã (*Prochilodus scrofa e Prochilodus affinis*), piapara (*Leporinus elongatus e Leporinus obtusindes*), piau (*Leporinus friderici*), piau branco (*Schizodon knerri*), jundiá (*Rhamdia quelen*) e na piabanha (*Brycon insignis*), segundo Baldisserotto (2002).

As doses de hipófise, bem como o tempo de espera entre a primeira e a segunda aplicação, podem variar, dependendo do grau de maturidade gonadal em que se encontram os reprodutores e também a temperatura da água.

Em 1996, Sato et al. reuniram dados sobre a reprodução induzida de curimatã (*Prochilodus affinis*), com a utilização de extrato de hipófise em duas doses para as fêmeas, tendo, como dose inicial,  $0,8 \pm 0,2$  mg/kg e  $5,7 \pm 0,4$  mg/kg, na dose final. O intervalo entre as doses foi de  $16,5 \pm 2,3$  horas e aplicou-se uma única dose de  $2,8 \pm 0,4$  mg/kg nos machos. Nestas condições, esses autores obtiveram uma resposta à ovulação em 76% das fêmeas a  $219 \pm 12$  horas-graus após a aplicação da 2ª dose, à temperatura de  $23,9 \pm 0,8^\circ\text{C}$ .

As gonadotrofinas de mamífero,s sendo facilmente obtidas no comércio, e de baixo custo, são substâncias alternativas ao uso de hipófise de carpa para a indução de desova e espermiacão em peixes de água doce (Baldisserotto, 2002). Não há relatos da utilização da gonadotropina coriônica equina (eCG) na indução da reprodução em peixes. Também chamada de gonadotrofina séria de

égua prenhe (PMSG), é o único hormônio glicoprotéico que contém atividades de FSH e LH na mesma molécula (Hafez, 2004). Este hormônio é muito utilizado em mamíferos, pois atua diretamente no ovário, estimulando o crescimento folicular e a ovulação.

A gonadotropina mais utilizada, atualmente, nas pesquisa de indução da reprodução em peixes é a gonadotropina coriônica humana (hCG) (Tabela 3). Segundo Baldisserotto (2002), o hCG parece ser muito eficiente na espermiacção dentre as gonadotrofinas usadas em peixes. Woynarovich & Horvath (1989) comentaram que somente aqueles peixes que estão bem preparados e totalmente maduros para o tratamento com hormônio reagem bem à administração de hCG.

As doses de hCG utilizadas podem variar muito, conforme a espécie e o laboratório que produziu o hormônio. Sallum (1990) utilizou hCG na indução da curimata (*Prochilodus affinis*), na dosagem única de 6.000-7.000 UI/kg e verificou uma resposta positiva ao hCG em 45% das fêmeas. No pacu (*P. mesopotamicus*) e no tambaqui (*C. macropomum*), por exemplo, doses de 30.000 a 41.000 UI/kg de hCG induziram à desova das fêmeas. Em machos de tambaqui, doses de 2.000 UI/kg apresentaram resultados positivos. Para *P. orbignyanus*, são recomendadas doses únicas de 500 a 800 UI/kg para fêmea e 300 a 400 UI/kg para machos. As fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelem*) respondem bem ao hCG, pois doses de 100 a 400 UI/kg são suficientes para provocar a desova.

Também Fenerich et al. (1980) realizaram ensaios com doses de hCG (5 e 10 UI/g), com diferença de sete horas entre as aplicações deste hormônio. A resposta, nesse trabalho, foi positiva, à temperatura de 26°C, oito horas mais tarde, em 30% das fêmeas. Ayroza et al. (1992), utilizando doses similares de hCG com intervalo de 10 horas entre as doses, em oito fêmeas de *P. scrofa*, obtiveram resultados positivos e taxa de fertilização de 99%.

**TABELA 3:** Utilização de gonadotropina coriônica humana (hCG) na indução da reprodução de várias espécies de peixes.

Substâncias	Hormônios	Dosagem (UI/kg)	Espécies	Referência
		500, 1000	<i>E. striatus</i>	Watanabe et al., 1995
		5, 10	<i>P. scrofa</i>	Kavamoto et al., 1997
		150 , 500	<i>S. vitreum</i>	Malison et al., 1998
		5	<i>B. insignis</i>	Andrade-Talmelli et al., 2002
		1100 e 550	<i>L. campechanus</i>	Paranikos et al., 2003
		5000, 1000	<i>O. bonariensis</i>	Leonardo et al., 2004
Gonadotrofinas de mamíferos	hCG	150 e 200	<i>B. bidyanus</i>	Levavi-Sivan et al., 2004
		2000	<i>A. ruthenus</i> L.	Rzemienieck et al., 2004
		100, 300, 500 , 750	<i>M. furnieri</i>	García-Alonso & Vizziano, 2004
		200	<i>A. anguilla</i>	Pedersen , 2004
		125 e 1000	<i>A. anguilla</i>	Palstra et al., 2005
		1.5	<i>H. longifilis</i> <i>A. anguilla</i>	Nguenga et al., 2004 Asturiano et al., 2005
		39, 78, 156, 312, 625	<i>A. anguilla</i>	Miranda et al., 2005
		500, 2000, 25000	<i>T. ocellatus</i>	Chen, 2005
		500	<i>S. japonicus</i>	Shiraishi et al., 2005

No trabalho desenvolvido por Narahara et al. (2002), estudando a reprodução de piabanha (*Brycon insignis*), o hCG, em dose única de 5 UI/g, apresentou maior eficiência quando comparado com o uso do extrato bruto de hipófise. Estes autores afirmam que o hCG é um potente indutor da reprodução em peixes e apresenta, como vantagens a certeza da igualdade das dosagens e de poder induzir a maturação final, a ovulação e a espermição.

A utilização de gonadotropina associada a extratos hipofisários parece ser o método freqüente para potencializar a ação hormonal nas gônadas. Na Tabela 4 são apresentadas algumas associações de substâncias indutoras da reprodução, sua dosagens e espécies.

O extrato de hipófise de carpa (EHC), o extrato de hipófise de salmão (EHS) e o pregnyl (hCG) foram utilizados, por Castagnolli & Cyrino (1980), para a indução de fêmeas de curimatá (*P. scrofa*) com peso entre 600 e 3.000 g, provenientes do rio Mogi Guaçu. Foram obtidos bons resultados no tratamento, quando a combinação de EHS e hCG em doses de 0,5 mg/kg, 2 UI/g e 3 UI/g, com intervalo de 8 horas entre as três doses. Silva Filho (1980) utilizou hipófise de carpa comum (1,5 mg/kg) conservada em álcool, combinada com pregnyl (hCG), na dose de 2 UI/g, na reprodução de *Prochilodus scrofa*, obtendo resultados favoráveis.

Os agentes antidopamínicos como a domperidona (DOM), podem potencializar a indução da ovulação, quando utilizados em combinação com o extrato de hipófise e com outros hormônios sintéticos (Kubitza, 2004).

**TABELA 4:** Diferentes associações de substâncias utilizadas na indução da reprodução de várias espécies de peixes.

Associações de hormônios	Dosagem	Espécies	Referência
sGnRH <sub>a</sub> + domperidona	20 µg/kg + 5 mg/kg	<i>B. bidyanus</i>	Levavi-Sivan et al., 2004
mGnRGa+domperidona	20 µg/kg + 10 mg/kg	<i>C. nasus</i>	Szabó et al., 2002
LHRH a + DOM	0,01 e 0,005 µg/kg + 5 - 7 mg/kg	<i>Silurus asotus</i>	Wen & Lin, 2004
	50 e 100 µg/kg + 3,5 e 6,5 mg/kg	<i>P. mesopotamicus</i>	Rosa, 1992
EBHC + LHRH a	0,5 e 5 mg/kg + 0.003 e 0,007µg/kg	<i>Silurus asotus</i>	Wen & Lin, 2004
EBHC + hCG	0,5mg/kg + 5000UI/kg	<i>B. insignis</i>	Andrade-Talmelli et al., 2002
		<i>O. bonariensis</i>	Leonardo et al., 2004
EBHC + EBHC/hCG	0,5mg/kg + 4,5 e 5,0mg/kg / 1000-3000 UI/kg	<i>B. orbignyana</i>	CESP(1994)
hCG + LHRH a	100 e 2000 UI/kg + 0,003 e 0,007 µg/kg	<i>Silurus asotus</i>	Wen & Lin, 2004

Para a indução da reprodução da piracanjuba (*Brycon orbignyana*), técnicos da CESP (1994) utilizaram a combinação do hCG (Pregnyl) e do extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC). A primeira dosagem nas fêmeas foi de 0,5 mg EBHC/kg, após intervalo de 8-11 horas, sendo a aplicação da segunda dosagem de 4,5-5,0 mg EBHC/kg, concomitantemente com a dose de 1.000 - 3.000 UI hCG/kg de peso vivo. Neste trabalho a dosagem que apresentou melhor resultado final para as fêmeas foi a primeira aplicação, com 0,5 mg EBHC/kg e de 4,5 mg EBHC/kg, juntamente com 3.000UI hCG na dose decisiva, com intervalo de 8 horas.

A ampla variação dos efeitos das substâncias indutoras demonstra claramente que se deve investigar qual a dose efetiva e o intervalo entre as doses em cada espécie.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local e período experimental

O trabalho foi realizado na Estação Ambiental de Itutinga, da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-CEMIG), no município de Itutinga-MG e no Laboratório do setor de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA), durante o período reprodutivo da curimba, de novembro de 2005 a janeiro de 2006.

A temperatura média no período experimental variou de 17,4°C a 25,0°C, índice pluviométrico de 4 mm e 85,7% de umidade relativa média do ar, de acordo com o Sistema de Telemetria e Hidrometeorologia da Companhia Energética de Minas Gerais (STM-CEMIG).

#### 3.2 Seleção dos reprodutores

Foram utilizados 25 fêmeas e 33 machos de curimba (*Prochilodus lineatus*) do plantel da EAI-CEMIG, mantidos em tanques de terra. A seleção dos reprodutores é um ponto muito importante na indução hormonal. Este processo é baseado em sinais externos que acompanham a maturação gonadal. Os reprodutores foram selecionados para o experimento de acordo com as características reprodutivas citadas por Woynarovich & Horváth (1989). Os machos aptos à reprodução liberavam algumas gotas de sêmen sob leve massagem abdominal. As fêmeas adequadas para a indução hormonal da desova apresentavam o abdômen desenvolvido e macio ao toque, papila urogenital proeminente e de coloração rosada ou avermelhada e o orifício genital ligeiramente aberto.

Após a seleção, os reprodutores foram marcados com fios de linha de cores diferentes, na altura do primeiro raio da nadadeira dorsal. Durante a marcação, os reprodutores foram pesados individualmente para se calcular a dose de hormônio aplicada. Em seguida, os reprodutores foram acondicionados em aquários de alvenaria com capacidade para 2000 litros, com temperatura (28°C) controlada e renovação contínua de água.

### **3.3 Tratamento hormonal**

A indução hormonal foi realizada em duas doses, uma dose preparatória, para a maturação total e uma dose final para liberação dos gametas. Os animais foram contidos dentro do aquário, segurando na cabeça e no pedúnculo caudal, sendo retirados parcialmente da água. Em seguida, aplicou-se a dose hormonal utilizando-se seringa graduada de 1 mL, na base da nadadeira dorsal, por via intramuscular. As fêmeas de curimba foram submetidas a três tratamentos e os machos a quatro tratamentos diferentes, quanto ao tipo de hormônio e à dosagem empregados (Tabelas 5 e 6). Os hormônios utilizados neste experimento foram o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) e a gonadotropina coriônica equina (eCG, NOVORMON®).

**TABELA 5:** Tratamentos estabelecidos para a indução da desova das fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*).

Tratamento	Doses		Intervalo (h)	Nº peixes
	1ª	2ª		
A	EBHC 0,5 mg/kg	EBHC 5,0 mg/kg	12	14
B	EBHC 0,5 mg/kg	EBHC 5,0 mg/kg eCG 500 UI/kg	12	7
C	EBHC 0,5 mg/kg	eCG 500 UI/kg	12	4

EBHC: extrato bruto de hipófise de carpa; eCG: gonadotropina coriônica equina

**TABELA 6:** Tratamentos estabelecidos para a indução da espermiação dos machos de curimba (*Prochilodus lineatus*).

Tratamento	Doses		Intervalo (h)	Nº peixes
	1ª	2ª		
A	EBHC 0,5 mg/kg	EBHC 5,0 mg/kg	12	19
B	EBHC 0,5 mg/kg	EBHC 5,0 mg/kg eCG 500 UI/kg	12	5
C	EBHC 0,5 mg/kg	eCG 500 UI/kg	12	4
D	eCG 500 UI/kg	eCG 500 UI/kg	12	5

EBHC: extrato bruto de hipófise de carpa; eCG: gonadotropina coriônica equina

O extrato bruto de hipófise de carpa foi preparado segundo metodologia da EAI-CEMIG, descrita por Silva (2000). A solução utilizada para diluir a hipófise é a solução fisiológica. A quantidade de solução fisiológica injetada nos reprodutores é de 0,2 ml de solução fisiológica para cada 1,0 kg. Para que não ocorram perdas durante a aplicação, acrescentou-se um pouco mais de solução

fisiológica. O extrato foi pesado e colocado em um cadinho contendo duas a três gotas de glicerina para auxiliar na maceração e logo em seguida acrescentou-se a solução fisiológica.

O Novormon® é uma preparação altamente purificada de gonadotropina coriônica eqüina (eCG, PMSG) produzida pela Syntex S.A., este hormônio foi diluído segundo a prescrição do laboratório de fabricação.

A partir da segunda dose dos tratamentos hormonais, aferiu-se a temperatura da água dos aquários a cada hora, com precisão de 1°C, para se determinar a hora-grau necessária para a ocorrência da ovulação e conseqüente extrusão dos gametas.

### **3.4 Coleta de ovócitos e desova**

#### **3.4.1 Análise dos ovócitos**

Foram realizadas duas análises dos ovócitos das fêmeas para se determinar o estágio de desenvolvimento ovariano, sendo a primeira avaliação realizada cinco horas após a segunda aplicação hormonal e a segunda avaliação oito horas após a segunda aplicação hormonal. Foram coletadas amostras de ovócitos intra-ováricos, com o auxílio de sonda uretral nº 8, introduzida pela papila urogenital. Para estas avaliações, as fêmeas foram manipuladas dentro do próprio aquário, para minimizar o estresse do manejo. O grau de desenvolvimento dos ovários foi verificado por meio da análise da migração da vesícula germinativa (núcleo) e mensuração dos diâmetros dos ovócitos.

Para a mensuração do diâmetro dos ovócitos, uma das amostras de ovócitos foi fixada em solução de Gilson (50 mL de álcool 60%, 440 mL de água destilada, 7 mL de ácido nítrico, 10g de cloreto mercúrico - HgCl<sub>2</sub> e 9 mL de ácido acético glacial) por 30 minutos, e os ovócitos foram medidos (mm) com auxílio de ocular micrométrica (10x), sob microscópio óptico (40x).

Outra amostra foi fixada em líquido de Serra (60 mL de álcool 90°GL; 30 mL de formalina e 10mL de ácido acético glacial), para a avaliação da migração da vesícula germinativa, a qual permitiu a visualização do núcleo. O exame foi realizado após um minuto de fixação nesta solução, com auxílio de microscópio estereoscópico. Foram consideradas duas categorias de ovócitos, segundo Murgas et al. (2003), ovócitos com núcleo em posição central e ovócitos com núcleo em posição periférica.

### **3.4.2 Peso da desova**

A desova ocorreu entre 8 e 9 horas após a segunda aplicação hormonal; as fêmeas foram retiradas do aquário envolvidas em toalhas úmidas e apoiadas sobre uma espuma, na mesa de manipulação. Em seguida, a papila urogenital e a nadadeira anal foram enxugadas com toalhas de papel, evitando o contato dos ovócitos com a água. Os ovócitos foram extruídos por meio de massagens manuais na parede celomática, no sentido crânio-caudal. A desova foi realizada em béquer ou recipiente plástico previamente limpo e seco. Após a obtenção das desovas, estas foram pesadas para o cálculo do índice gonadosomático, de acordo com a seguinte relação:  $IGS = \text{peso da ova} \times 100 / \text{peso corporal do animal}$  (Sato et al., 2003).

Nas fêmeas que não desovaram no período de 8 a 9 horas após a segunda aplicação hormonal, procedeu-se a canulação, para a obtenção de amostra de ovócitos para posterior avaliação.

### 3.5 Coleta de sêmen e avaliação das características seminais

Para a coleta de sêmen, os machos de curimba foram retirados do aquário envolvidos em toalhas úmidas e apoiados sobre uma espuma, na mesa de manipulação. Em seguida, a papila urogenital e a nadadeira anal foram enxugadas com toalhas de papel, evitando o contato do sêmen com a água.

O sêmen foi obtido por meio de massagens manuais na parede celomática, no sentido crânio-caudal e coletado em tubos de ensaio graduado esterilizado, no qual se obteve o volume total produzido por cada reprodutor. Foram avaliadas as seguintes características: volume total (ml), concentração de espermatozóides (spt/ml), motilidade espermática (%), duração da motilidade (segundos) e morfologia espermática (%).

A motilidade espermática foi avaliada para expressar a porcentagem total de espermatozóides móveis, enquanto que a duração da motilidade baseou-se no tempo em que os espermatozóides permaneceram móveis. Para estas avaliações, foram preparadas lâminas de microscopia ótica com uma gota de sêmen diluído em uma gota de água destilada à temperatura ambiente, levadas ao microscópio óptico em aumento de 400 vezes. Para a variável motilidade espermática, utilizou-se um escore de 0% a 100%. A duração da motilidade foi medida com auxílio de um cronômetro digital, o qual foi acionado no momento da diluição do sêmen e foi encerrado quando o sêmen atingia uma motilidade mínima de 10%.

A concentração espermática foi mensurada tomando-se uma amostra de 10  $\mu$ L de sêmen diluído em 990  $\mu$ L de formol citrato. A partir disso, foram tomados 10  $\mu$ L dessa diluição e foi colocado em 990  $\mu$ L de formol citrato, resultando em uma diluição de 1:10000. Após a diluição, preencheu-se, por capilaridade, a câmara de Neubauer e, posteriormente, obteve-se a quantidade de espermatozóides por ml de sêmen.

Para a verificação de anormalidades espermáticas foi utilizado um microscópio óptico composto, com iluminação episcópica fluorescente (Nikon, modelo OPTIPHOT-2) do Departamento de Ciências dos Solos da Universidade Federal de Lavras. Com um aumento total de 1000 dioptrias, foi realizada uma contagem diferencial de 100 células das amostras de sêmen previamente fixadas em solução de formol citrato (10  $\mu$ L de sêmen:990  $\mu$ L de solução de formol citrato).

As patologias espermáticas foram classificadas de acordo com Moraes et al. (2004), da seguinte forma:

(a) espermatozóides normais

(b) espermatozóides com anormalidades:

(b-1) cabeça: macrocefalia, microcefalia e isolada normal;

(b-2) flagelo: fraturado, enrolado, degenerado, dobrado e gotas citoplasmáticas proximal e distal.

### **3.6 Análise estatística**

Para os parâmetros como migração da vesícula germinativa (núcleo), cinco horas e oito horas após a segunda aplicação hormonal e morfologia espermática, foi adotado o teste de qui-quadrado, para verificar a frequência dos dados, utilizando a teoria de modelos lineares generalizados, uma vez que estes não atendem à pressuposição de normalidade.

Segundo Costa (2003), a teoria de modelos lineares generalizados (GLM) consiste em considerar, para uma amostra de  $n$  observações de uma única variável resposta  $Y$  (exemplo, nº. de patologias), a existência de três componentes:

1- componente aleatório: as  $n$  variáveis respostas;

- 2- componente sistemático: as variáveis explanatórias (tratamentos) que dão origem ao que chamamos de vetor de preditores lineares;
- 3- função de ligação: faz a ligação entre o componente aleatório (item 1) e o componente sistemático (item 2) por meio de uma função conhecida.

Para a distribuição binomial (contagens finitas), a função de ligação, conhecida como função logit, é dada por :

$$g(.) = \text{Ln} (p/1-p)$$

em que:  $\text{Ln}$  é o símbolo de logaritmo neperiano e  $p$  é a proporção de ocorrência do evento.

Para as variáveis peso da desova e diâmetro médio dos ovócitos, cinco horas e oito horas após a segunda aplicação hormonal e índice gonadossomático (IGS) que competem às fêmeas e variáveis como motilidade, duração, volume e concentração de espermatozóides, que competem aos machos, foram feitas análises de variâncias, considerando um experimento inteiramente casualizado com número diferente de repetições por tratamento. As médias foram comparadas pelo teste Tukey, com um nível nominal de significância de 5%.

As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se o programa Statistical Analysis System (SAS, 1995).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação dos ovócitos e da desova

A desova das fêmeas induzidas ocorreu entre 224 a 252 horas-graus após a segunda aplicação hormonal, com temperatura de 28°C, valor que se encontra na faixa de horas-graus para *Prochilodus* sp (Sato et al., 2003).

Os valores médios de peso da desova, diâmetro dos ovócitos cinco horas e oito horas após a segunda aplicação hormonal e do índice gonadossomático das fêmeas de curimba que receberam diferentes tratamentos hormonais estão representados na Tabela 7. As fêmeas induzidas pelos tratamentos A (0,5 e 5,0 mg/kg EBHC) e B (0,5 e 5,0 mg/kg EBHC + 500 UI/kg eCG) não apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o peso das desovas, enquanto que as fêmeas induzidas pelo tratamento C (0,5 mg/kg EBHC e 500 UI/kg eCG) não desovaram, no período de 8 a 9 horas após a segunda aplicação.

**TABELA 7:** Valores médios do peso da desova (g), dos diâmetros médios dos ovócitos cinco horas e oito horas após a segunda aplicação hormonal (mm) e do índice gonadossomático (IGS) (%).

Tratamentos	Peso desova	Diâmetro médio dos ovócitos		IGS
		5 horas	8 horas	
A	221,7 a	1,36 a	1,36 a	12,8 a
B	213,5 a	1,39 a	1,27 b	13,8 a
C	0 b	1,29 a	1,24 b	0 b

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo, teste Tukey, com um nível nominal de significância de 5%.

(A) 0,5 mg/kg EBHC e 5,0 mg/kg EBHC; (B) 0,5 mg/kg EBHC e 5,0 mg/kg EBHC + 500 UI/kg eCG; (C) 0,5 mg/kg EBHC e 500 UI/kg eCG.

O tratamento A (0,5 e 5,0 mg/kg EBHC) foi utilizado como tratamento controle positivo, devido aos ótimos resultados obtidos com esta dosagem em reproduções anteriores no EAI-CEMIG. Desta dosagem é amplamente utilizada em várias espécies, como curimba (*Prochilodus lineatus*), dourado (*Salminus brasilienses*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), piapara (*Leporinus obtusidens*) e piracanjuba (*Brycon orbinyanus*), entre outros (Silva, 2000).

Neste experimento, foram obtidos 100% de desova nas fêmeas tratadas com 0,5 e 5,0 mg/kg de extrato bruto de hipófise de carpa. Chen (2005) obteve 100% de desova em fêmeas tratadas com 6 mg/kg de extrato bruto de hipófise de carpa em *Takifugu ocellatus*. Por outro lado, Narahara et al. (2002), testando um método de indução da reprodução em pirapitinga (*B. opalinus*), utilizaram uma dosagem de 5 e 10 mg/kg de extrato bruto de hipófise de salmão e apenas 48% das fêmeas desovaram. Szabó et al. (2002) obiveram 66,6% de fêmeas desovadas, utilizando 3 e 6 mg/kg de extrato bruto de hipófise de carpa na indução da ovulação de *Chondrostoma nasus*. Estes resultados demonstram que há uma grande variação na resposta à dose hormonal aplicada nas diferentes espécies de peixes.

Outro fator importante que se deve levar em consideração é a qualidade das hipófises para fins de indução hormonal em peixes, por ser dependente do grau de maturação em que se encontrava o peixe doador da hipófise (Woynarovich & Horváth, 1989; Harvey & Carolsfeld, 1993; Baldisserotto, 2002). Quanto mais próximo do estado de maturação final e da ovulação, maior a concentração de gonadotropinas na hipófise do peixe doador (Kubitza, 2004).

Os hormônios sintéticos não apresentam dificuldade de padronização quanto à quantidade de gonadotropinas em sua composição, ao contrário da hipófise de peixes doadores. Por isso, várias pesquisas têm sido conduzidas com o objetivo de testar substâncias alternativas para a utilização nas técnicas de

reprodução induzida em peixes. Não existem relatos, na literatura científica, sobre a utilização da gonadotropina coriônica eqüina (eCG) na indução da reprodução de peixes. Por isso, os resultados encontrados neste experimento foram comparados com pesquisas feitas com gonadotropina coriônica humana (hCG), que tem atividade biológica semelhante ao eCG.

Segundo Woynarovich & Horváth (1989), a fase de pré-ovulação pode, geralmente, ser obtida facilmente, administrando-se hCG; mas, é difícil alcançar a plena ovulação por meio desse método na maioria dos peixes, somente aqueles peixes que estão bem preparados e totalmente maduros para o tratamento com hormônio reagem à administração de hCG. Além disso, vários fatores ambientais podem desempenhar um papel importante no sucesso do tratamento com hCG.

Técnicos da CESP (1994), segundo Sallum (1999), obtiveram resultados positivos na indução da reprodução da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com uma dosagem de 0,5 mg de EBHC/kg na primeira aplicação e 4,5 mg EBHC/kg juntamente com 3.000 UI hCG/kg na dose decisiva. Esses resultados são semelhantes aos encontrados neste experimento, quando utilizaram-se 0,5 mg EBHC/kg, na primeira aplicação hormonal e 5,0 mg EBHC/kg, juntamente com 500UI eCG/kg, na segunda aplicação hormonal.

Na avaliação do diâmetro dos ovócitos cinco horas após a segunda aplicação hormonal, não foi constatada diferença significativa entre os tratamentos testados (A: 1,36mm; B: 1,39mm; C: 1,29mm). Os diâmetros médios dos ovócitos oito horas após a segunda aplicação hormonal, nos tratamentos B e C, foram diferentes estatisticamente ( $P < 0,05$ ) do tratamento A (Tabela 7). O diâmetro dos ovócitos encontrado neste experimento foi inferior ao relatado por Vazzoler (1996) para *Prochilodus lineatus*, que foi de 1,45 mm. Esse mesmo autor relatou que há uma tendência de variação do diâmetro de

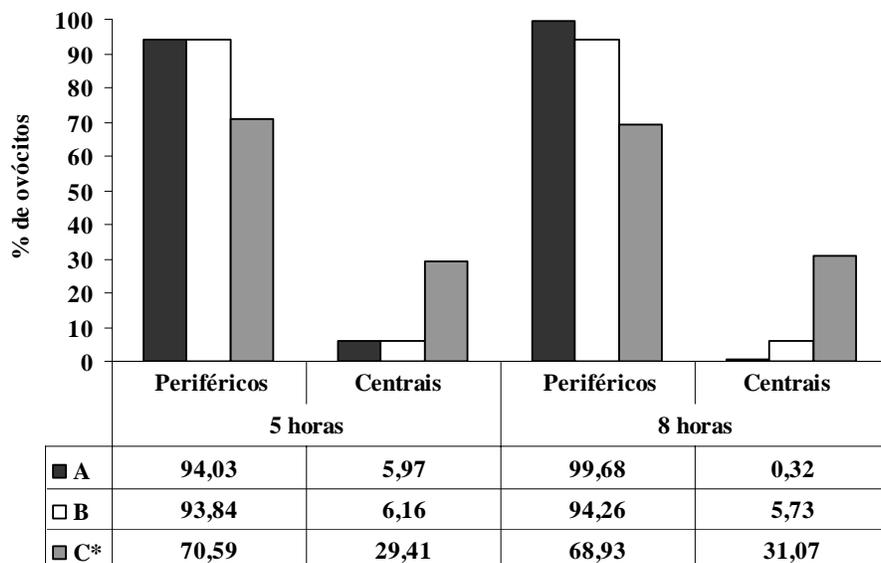
acordo com o comportamento reprodutivo, em que espécies migradoras de grande porte, como a curimba, têm diâmetro de ovócitos médios.

Adebayo & Fagbenro (2004) induziram a ovulação e a desova artificial de *H. bidorsalis*, utilizando 4 mg/kg de extrato bruto de hipófise de carpa e 200 UI/kg de gonadotropina coriônica humana e observaram que todas as fêmeas dos grupos testados nos diferentes tratamentos desovaram. Foi avaliado também o diâmetro inicial e o diâmetro final dos ovócitos das fêmeas tratadas e observou-se que o diâmetro inicial foi menor que o diâmetro final para todos os tratamentos. Segundo Vazzoler (1981), o diâmetro dos ovócitos é um método rápido para a confirmação do estágio de maturidade dos peixes e, por isso, é muito utilizado para a seleção de fêmeas reprodutoras.

O índice gonadossomático expressa a porcentagem que as gônadas representam do peso do corpo dos indivíduos e parece um indicador eficiente do estado funcional dos ovários (Vazzoler, 1996). Os valores para este parâmetro encontram-se abaixo da faixa apresentada por Sato et al. (2003), a qual variou de 14 a 26,2, para *Prochilodus sp.*

De acordo com Murgas et al. (2003), assim como a avaliação do diâmetro dos ovócitos, as fêmeas reprodutoras podem ser selecionadas utilizando-se a posição do núcleo nos ovócitos como indicador do grau de desenvolvimento gonadal. Este método é muito utilizado em diversas espécies de peixes.

Na avaliação do posicionamento da vesícula germinativa (núcleo), os tratamentos A e B foram diferentes estatisticamente ( $P < 0,05$ ) do tratamento C, tanto na avaliação realizada às cinco horas quanto às oito horas após a segunda aplicação hormonal (Figura 3). Isso demonstra que as fêmeas dos tratamentos A e B estavam numa fase adiantada de maturação, provavelmente influenciadas pelos tratamentos.



**FIGURA 3:** Proporções dos núcleos dos ovócitos, cinco horas e oito horas após a segunda aplicação hormonal, em função do seu posicionamento, para cada um dos tratamentos testados. (A) 0,5 mg/kg EBHC e 5,0 mg/kg EBHC; (B) 0,5 mg/kg EBHC e 5,0 mg/kg EBHC + 500 UI/kg eCG; (C) 0,5 mg/kg EBHC e 500 UI/kg eCG.

\* diferente dos demais tratamentos, pelo teste qui-quadrado.

A função respectiva de cada gonadotropina no controle da reprodução em peixes foi estudada principalmente em salmonídeos. Assim, o FSH estaria associado, principalmente, como o início da maturação e como o processo vitelogênico (incorporação da vitelogenina pelo ovócito), enquanto que o LH estaria associado com a liberação dos esteróides maturacionais que, por sua vez, induziriam a maturação final do ovócito e a ovulação (Iseki & Negrão, 2003).

O eCG possui atividade biológica semelhante, tanto ao FSH quanto ao LH, porém, predominantemente ao FSH (Hafez, 2004). Isso justifica a baixa eficiência na indução da desova nas fêmeas de curimba tratadas com a combinação do EBHC na primeira aplicação hormonal e eCG na segunda.

Supõe-se que a utilização do eCG na primeira aplicação hormonal e de EBHC na segunda poderá desencadear o processo de maturação e ovulação das fêmeas de curimba (*Prochilodus lineatus*).

A maturação final e a ovulação são processos complexos, cujo tempo de duração leva várias horas, sendo influenciada pela temperatura da água. Duas fases são diferenciadas: maturação final ou pré-ovulação e ovulação. Se o tratamento hormonal não obtiver êxito, as gônadas interrompem o desenvolvimento causando atresia dos ovócitos e podem até levar o reprodutor à morte (Woynarovich & Horváth, 1989).

Por outro lado, na ovulação, os níveis de LH caem, indicando que as gonadotropinas não estariam diretamente ou totalmente envolvidas na indução da ovulação que, aparentemente, dependeria da síntese de prostaglandinas, responsáveis pela ruptura da parede folicular dos ovócitos (Berndtson et al., 1989). Isso comprova a eficiência do EBHC na indução da desova em peixes, por apresentar várias substâncias capazes de estimular todo o processo endócrino para a reprodução induzida.

#### **4.2 Avaliação das características seminais**

A análise do sêmen, em peixes, não é realizada rotineiramente nas estações de piscicultura, uma vez que a qualidade do sêmen é um fator preponderante na taxa de fertilização e eclosão, estando diretamente relacionado ao tipo, à dosagem e ao número de doses prévias de hormônio utilizado na indução.

Os resultados da análise das características espermáticas dos machos de curimba (*Prochilodus lineatus*) tratados com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) e gonadotrofina coriônica equina (eCG) estão apresentados na Tabela 8.

**TABELA 8:** Valores médios de volume total (ml), concentração do sêmen ( $\times 10^9$ spt/ml), motilidade (%) e duração da motilidade espermática (segundos) de curimba (*Prochilodus lineatus*).

Tratamentos	Características seminais			
	Volume seminal	Concentração espermática	Motilidade espermática	Duração da motilidade
A	2,62 a	33,22 a	97,7 a	54,5 a
B	2,45 a	63,33 a	97,5 a	58,0 a
C	2,48 a	47,38 a	100,0 a	53,0 a
D	1,81 a	36,20 a	99,0 a	53,8 a

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste Tukey, com um nível nominal de significância de 5%.

(A) 0,5 mg/kg EBHC e 5,0 mg/kg EBHC; (B) 0,5 mg/kg EBHC e 5,0 mg/kg EBHC + 500 UI/kg eCG; (C) 0,5 mg/kg EBHC e 500 UI/kg eCG; (D) 500 UI/kg e 500 UI/kg.

Os tratamentos não apresentaram diferença estatística significativa em relação a todas as características seminais avaliadas ( $P < 0,05$ ). O extrato bruto de hipófise de carpa é utilizado na indução da reprodução de espécies de peixes de piracema. Em pisciculturas, os machos recebem apenas uma dose de hormônio, geralmente no momento em que as fêmeas recebem a última dose decisiva, devido à maior facilidade de espermição causada, principalmente, pelo estresse durante o manejo (Woynarovich & Horváth, 1989).

Alguns estudos têm investigado a influência do uso de hormônios combinados com o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) ou até mesmo a sua substituição total por gonadotropinas de mamíferos. Miranda et al. (2005) utilizaram gonadotropina coriônica humana (hCG) e extrato bruto de hipófise de carpa na produção espermática de pijerrey, não tendo as variáveis concentração e motilidade espermática apresentado diferenças significativas entre os tratamentos. Neste estudo, os diferentes tratamentos hormonais não

influenciaram as características espermáticas avaliadas. Hafez (2004) afirma que cada hormônio possui um efeito seletivo sobre um ou mais órgãos alvos, além do quê, as ligações específicas são mecanismos usuais encontrados em grande parte dos mamíferos.

Segundo Cruz (2001) a curimba (*Prochilodus lineatus*) produz um volume de sêmen de 0,5 a 3,0 ml. O presente trabalho confirma esse resultado, em que o volume médio de sêmen produzido nos tratamentos testados foi de 2,62 ml, 2,45 ml, 2,48 ml e 1,81 ml, respectivamente para A, B, C e D. Os resultados encontrados neste experimento diferem dos resultados apresentados por outros autores. Streit Jr et al. (2004) obtiveram um volume médio de sêmen de 0,45 ml, utilizando extrato bruto de hipófise de carpa na indução da reprodução de curimba (*Prochilodus lineatus*) e Kavamoto et al. (1997), que utilizaram gonadotropina coriônica humana na indução da espermição em curimbatá (*Prochilodus scrofa*), observaram um volume médio de sêmen 0,22 ml. Segundo Streit JR et al. (2003), o volume de sêmen varia, entre outros fatores, quanto ao indutor e à espécie que está sendo induzida.

A concentração de espermatozoides não foi significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) para os quatro tratamentos utilizados. Resultados semelhantes foram encontrados por Miranda et al. (2005), sugerindo que a indução hormonal estimula tanto a espermição quanto a produção de plasma seminal. Segundo Souza et al. (2003), o número total de espermatozoides encontrados no sêmen liberado está diretamente relacionado ao volume e à concentração e pode variar de indivíduo para indivíduo. A concentração espermática varia de acordo com as características fisiológicas reprodutivas de espécie para espécie.

Os valores médios de concentração espermática, para todos os tratamentos testados apresentados neste experimento, foram superiores aos encontrados por outros autores na indução da reprodução de várias espécies de

peixes. Utilizando extrato bruto de hipófise de carpa, diferentes autores obtiveram  $14 \times 10^9/\text{ml}$ , em curimba (*Prochilodus lineatus*) e piavuçu (*Leporinus macrocephalus*);  $23,8 \times 10^9/\text{ml}$ , em carpa comum (*Cyprinus carpio*);  $18,62 \times 10^9/\text{ml}$ , em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e  $11,08 \times 10^9/\text{ml}$  em piapara (*Leporinus obtusidens*). Asturiano et al. (2005) e Rzemienieck et al. (2004) obtiveram  $1,5-2,5 \times 10^9/\text{ml}$ , em enguia européia e  $0,05 \times 10^9/\text{ml}$  em *A. ruthenus* L., utilizando gonadotropina coriônica humana.

Os tratamentos hormonais não influenciaram a motilidade espermática ( $P < 0,05$ ). Souza et al. (2003) mencionaram que a qualidade dos espermatozoides produzidos está diretamente ligada ao estado nutricional, a idade e ao genótipo do animal. Essa afirmação pode ser considerada válida para este trabalho, pois todos os animais, indiferente do tratamento, apresentaram ótimos resultados quanto à motilidade espermática.

A motilidade espermática encontrada por Streit Jr. et al. (2004), utilizando extrato bruto de hipófise de carpa em curimba (*Prochilodus lineatus*), foi de 50%. Por outro lado, Franciscato et al. (2002) obtiveram 100% de motilidade e 96 segundos de duração da motilidade espermática para a mesma espécie e com o mesmo indutor hormonal. Kavamoto et al. (1997 e 1999) obtiveram 92,36% e 94,17% de motilidade espermática para machos de curimatá (*Prochilodus scrofa*) induzidos com gonadotropina coriônica humana (hCG).

Em outras espécies, foram observados 54% de motilidade espermática para enguia européia (*Anguilla anguilla* L.), utilizando hCG na indução da espermição (Asturiano et al., 2005). Em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), 99,16% de motilidade e 62,5 segundos de duração da motilidade espermática (Miliorini et al., 2002), utilizando EBHC na indução da espermição. Esses valores são semelhantes os observados por Murgas et al. (2002), com piapara (*Leporinus obtusidens*).

Hafez (2004) afirmou que a motilidade é essencial para a fertilização em espermatozoides de mamíferos íntegros. Esse é, também, um fator de grande importância para espécies de peixes reofilicas, como a curimba, pois sua reprodução está, geralmente, sincronizada com fatores ambientais adequados às necessidades metabólicas, de tal forma que incremente a viabilidade dos gametas e favoreça o desenvolvimento da prole.

O conhecimento da motilidade, da duração da motilidade e as concentração espermática é importante para que se possa avaliar a qualidade do sêmen coletado e, com isso, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial.

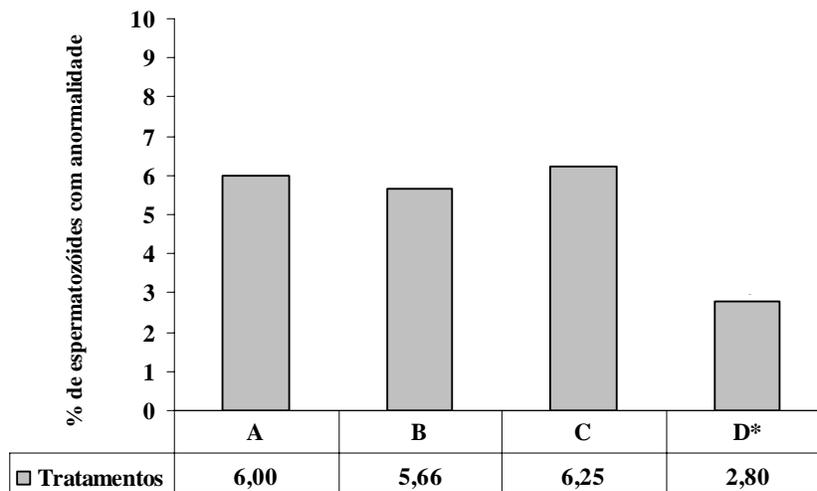
#### **4.3 Análise da morfologia espermática**

Os resultados das análises morfológicas estão apresentados na Figura 4, tendo havido diferença estatística significativa entre os protocolos hormonais utilizados ( $P < 0,05$ ).

Alguns protocolos hormonais têm sido investigados quanto à morfologia espermática. Moraes et al. (2004) utilizaram extrato de hipófise de carpa, de frango e de coelho na indução da espermiacção de machos de curimba, em aplicações únicas de 3,0; 5,0 e 7,0 mg de hipófise/kg de peso vivo de peixe, respectivamente. Entres os tratamentos utilizados, os autores não verificaram qualquer diferença nos índices de espermatozoides normais (59,8%; 55,9% e 57,4%).

Neste estudo, os índices encontrados foram de 6,0%; 5,6%; 6,25% e 2,8% de espermatozoides com anormalidades, nos respectivos tratamentos A, B, C e D, tendo, em média, sido encontrados 95% de espermatozoides sem qualquer anormalidade. O tratamento em que utilizaram-se duas doses de 500

UI/kg de gonadotropina coriônica eqüina foi diferente, estatisticamente, dos demais tratamentos, apresentando um menor número de espermatozóides com anormalidades.



**FIGURA 4:** Proporções de espermatozóides com anormalidades, para cada tratamento hormonal testado. (A) 0,5 mg/kg EBHC e 5,0 mg/kg EBHC; (B) 0,5 mg/kg EBHC e 5,0 mg/kg EBHC + 500 UI/kg eCG; (C) 0,5 mg/kg EBHC e 500 UI/kg eCG ; (D) 500 UI/kg eCG e 500 UI/kg eCG.

\* diferente dos demais tratamentos, pelo teste qui-quadrado.

Não há trabalhos, na literatura, relacionando o percentual de anormalidades espermáticas e o grau de comprometimento sobre a taxa de fertilização e eclodibilidade em peixes. Segundo Hafez (2004), um ejaculado com 30% de patologias primárias é considerado razoável para a reprodução de mamíferos domésticos. Nesse contexto, cabe discutir que a fertilização da curimba é externa e a espécie possui uma concentração espermática muito

superior à de mamíferos, sugerindo que, entre os peixes, há uma maior tolerância de patologias espermáticas, sobretudo se a reprodução for assistida.

Outros protocolos incluem a administração de gonadotropina coriônica humana (hCG). Dessa maneira, o valor médio de espermatozóides com anormalidades oscilou em torno de 9,54%, quando se utilizou uma dosagem de 5,0 UI/g de hCG (Kavamoto et al., 1999). Este resultado é superior aos encontrados no presente estudo, para o tratamento em que utilizaram-se duas doses de 500 UI/kg de eCG, tendo sido 2,8% de espermatozóides com anormalidades.

O FSH em machos está envolvido no início do crescimento testicular e na manutenção da espermatogênese. Assim como nas fêmeas, os machos tem seus níveis plasmáticos de LH aumentados nos estágios finais de maturação gonadal, atingindo um pico antes da espermição (Iseki & Negrão, 2003).

Os resultados deste trabalho demonstram que a atividade do LH foi suficiente para a indução da espermição em machos de curimba, mesmo com a atividade biológica predominante ao FSH, da gonadotropina coriônica eqüina. O FSH atuou na formação dos espermatozóides, confirmando os resultados encontrados quanto à morfologia espermática, a qual alcançou índices significativamente baixos de espermatozóides com anormalidades.

Geralmente, a rotina de avaliação espermática se restringe à análise do volume e da motilidade espermática. Dessa forma, a análise morfológica espermática é um parâmetro que pode auxiliar na caracterização de sêmen de reprodutores, além de inferir sobre valores de taxa de fertilização e eclodibilidade, estando diretamente relacionado ao tipo, à dosagem e ao número de doses prévias de hormônio utilizado na indução.

A pesquisa de novos protocolos hormonais e a submissão do protocolo utilizado no presente trabalho a novos experimentos tornam-se fundamentais para

a determinação da real influência sobre a fertilidade. A incorporação da análise morfológica do sêmen de peixes na rotina reprodutiva deve ser incentivada, como é para mamíferos, pois é uma ferramenta importante na solução de problemas reprodutivos ou, mesmo, na caracterização de protocolos biotecnológicos adequados para a espécie com a qual se pretende trabalhar.

## CONCLUSÕES

Nas condições em que este experimento foi realizado, pôde-se concluir que:

1. a gonadotropina coriônica equina não se mostrou eficiente, quando não combinada com o extrato bruto de hipófise de carpa na segunda aplicação hormonal, na indução da desova de curimba (*Prochilodus lineatus*);
2. a gonadotropina coriônica equina (eCG) pode substituir o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) sem alterar as características seminais da curimba (*Prochilodus lineatus*);
3. o eCG promove redução das alterações dos espermatozoides de curimba (*Prochilodus lineatus*).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAYO, O.T.; FAGBENRO, O.A. Induced ovulation and spawning of pond raised African giant catfish, *Heterobranchus biodorsalis* by exogenous hormones. **Aquaculture**, v.242, p.229-236, 2004.

ANDRADE-TALMELLI, E.F. et al. Reprodução induzida da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), mantida em cativeiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.803-811, 2002.

ARABACI, M.; DILER, I.; SARI, M. Induction and synchronisation of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRH $\alpha$ ) and its effects on egg quality. **Aquaculture**, v.237, p.475-484, 2004.

ASTURIANO, J.F. et al. Effect of different methods for the induction of spermiation on sêmen quality in European eel. **Aquaculture Research**, v.36, p.1480-1487, 2005.

AYROZA, L.M.S.; ROMAGOSA, E.; ANDRADE, E.F. Produção de alevinos do curimatá *Prochilodus scrofa*, na região do Vale do Ribeira – SP. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO DE PESCA, 1., 1992, São Paulo. **Programa e Resumo...** São Paulo: Instituto de Pesca, 1992. p.41.

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

BERNDTSON, A.K.; GOETZ, F.W.; DUMAN, P. In vitro ovulation, prostaglandin synthesis and proteolysis in isolated ovarian components of yellow perch (*Perca flavescens*): Effects of 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one and phorbol ester. **General and Comparative Endocrinology**, v.75, p.454-465, 1989.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. **Estatística de pesca 2004 Brasil**: grandes regiões e unidades da federação. Brasília, 2005. 98p.

CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J.E.P. Desova induzida do Curimbatá, *Prochilodus scrofa* Steinadachner 1881 (Pisces: Prochilodontidae). **Ciência e Cultura**, v.39, n.9, p.1245-1253, 1980.

CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J.E.P. **Piscicultura nos trópicos**. São Paulo: Manole, 1986. p.152.

CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. Family Prochilodontidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p.742.

CHEN, Y.F. Induced ovulation and embryonic development of ocellated puffer, *Takifugu ocellatus*. **Journal Applied Ichthyol.**, v.21, p.136-140, 2005.

COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais. **Guia ilustrado de peixes da Bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144p.

COMPANHIA ENERGÉTICA DE SÃO PAULO. **Produção de alevinos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. São Paulo, 1994 (Relatório Final).

COSTA, S.C. da. **Modelos lineares generalizados mistos para dados longitudinais**. 2003. 110p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

COWARD, K. et al. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.12, p.33-58, 2002.

CRUZ, V.L.B. **Criopreservação do sêmen de curimbatá (*P. lineatus*)**. 2001. 59p. Dissertação (Mestrado em Zoologia)-Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG.

CURI, M.X.; TSUKAMATO, R.Y. A utilização de LH-RH comum (gonadorrelina) na reprodução induzida do pacu, *Colossoma mitrei* Berg. em condições de campos (Pisces, Serrassalmidae). In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO, 6.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 5., 1988, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, SC, 1988. p.505-512.

FENERICH, N.A.; GODHINO, H.M.; NARAHARA, M.Y. Emprego de Gonadotropina Corionica humana (hCG) na indução de reprodução do curimatá *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE AQUICULTURA, 2.; ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTORES, 2., 1980, Jaboticabal. **Anais...** Brasília: SUDEPE, 1980. p.106-107.

FRANCISCATTO, R.T. et al. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após o resfriamento à 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 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 Fishes**, v.46, n.3, p.297-307, 1996.

GARCIA-ALONSO, J.; VIZZIANO, D. Induction of oocyte maturation in the white croaker *Micropogonias furnieri* (Pisces: Sciaenidae) by human chorionic gonadotropin. **Braz. J. Biol.**, v.64, n.1, p.73-80, 2004.

GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. 468p.

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

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

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

KAVAMOTO, E.T. et al. Produção espermática do curimatá *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.24, p.73-78, 1997.

KAVAMOTO, E.T. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus scrofa*(Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.25, p.61-66, 1999.

KUBITZA, F. **Reprodução, larvicultura e produção e produção de alevinos de peixes nativos.** Jundiaí: F. Kubitza, 2004. 71p.

LEONARDO, A.F.G. et al. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). **Aquaculture**, v.240, p.451-461. 2004.

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

MALISON, J.A. et al. Induction of out-of-season spawning in Walleye (*Stizostedion vitreum*). **Aquaculture**, v.136, p.151-161, 1998.

MILIORINI, A.B. et al. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) à 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.209-211, 2002.

MIRANDA, L.A.; CASSARÁ, M.C.; SOMOZA, G.M. Increase in milt production by hormonal treatment in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture Research**, v.36, p.1473-1479, 2005.

MORAES, G.V. et al. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozoides de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimatá (*Prochilodus lineatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.30, n.2, p.109-116, 2004.

MURGAS, L.D.S. et al. Viabilidade seminal de piapara (*Leporinus obtusidens*) empregando-se diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen à 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.211-213, 2002.

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

NARAHARA, M.Y. et al. Reprodução induzida da Pirapitinga-do-sul, *Brycon opalinus*, mantida em condições de confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1070-1075, maio/jun. 2002.

NGUENGA, D. et al. Influence of tropical seasonal changes on oocyte diameter, responses to hormonal induction and hatching quality in two strains of the catfish, *Heterobranchus longifilis* Val. (Clariidae). **Aquaculture Research**, v.35, p.1349-1357, 2004.

PALSTRA, A.P. et al. Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. **Aquaculture**, v.249, p.533-547, 2005.

PAPANIKOS, N. et al. Egg and larval quality of natural and induced spawns of red snapper, *Lutjanus campechanus*. **Fisch Physiology and Biochemistry**, v.28, p.487-488, 2003.

PEDERSEN, B. H. Fertilisation of eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the European eel *Anguilla anguilla*. **Aquaculture**, v.237, p.461-473, 2004

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

ROSA, A.B. de S. **Efeitos da aplicação de LHRH, associado a um antagonista de dopamina na maturação final ovocitária e na desova de fêmeas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMERC, 1887) (TELESOSTEI HARACIDAE), em diferentes locais**. 1992. 95p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura)-Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

RZEMIENIECKI, A. et al. Induced spermiation in 3-year-old sterlet, *Acipenser ruthenus* L. **Aquaculture Research**, v.35, p.144-151, 2004.

SAS. SAS/STAT Software. **Guide for personal computers**. Cary, New York, 1995.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H.P. **Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco**. In: GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p.275-289.

SATO, Y. et al. Hypophysation of the fish *Prochilodus affinis* from the Rio São Francisco basin, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.48, p.55-62, 1996. Supl. 1.

SALLUM, W.B. **Utilização de Gonadotropina Coriônica Human (hCG) e Extrato Bruto de Hipófise (EBH) na reprodução de Curimatá-piôa *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes, Prochilodontidae).** 1990. 38p. Monografia (Graduação)Fundação Universidade Federal de Maringá, Nupélia. Maringá. PR.

SALLUM, W.B. **Reprodução das principais espécies de peixes.** Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 47p. (Curso de Especialização em Piscicultura).

SHIRAIISHI, T. et al. Reproductive parameters of the chub macherel *Scomber japonicus* estimated from human chorionic gonadotropin-induced final oocyte maturation and ovulation in captivity. **Fisheries Science**, v.71, p.531-542, 2005.

SILVA, M.O.B. **Reprodução de peixes: princípios básicos de piscicultura.** Itutinga, CEMIG, p. 28-25, 2000.

SILVA FILHO, J.A. Contribuição ao estudo da reprodução induzida do curimatá comum *Prochilodus scrofa* Steinadachner, 1881, em cativeiro com uso da hipófise de carpa, *Cyprinus Carpio*, e Pregnyl. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE AQUICULTURA, 2.; ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTORES, 2., 1980, Jaboticabal. **Anais...** Brasília: SUDEPE, 1980. p.104-10.

SOUZA, E.D. et al. Extrato de hipófise de frango e coelho na indução reprodutiva da carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v.25, n.1, p.99-107, 2003.

STREIT JR., D.P. et al. Estudo comparativo da indução hormonal da espermiacão em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v.25, n.2, p.261-266, 2003.

STREIT JR., D.P. et al. Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa. **Brazilian**

**Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, n.3, p.147-153, 2004.

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

VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM; São Paulo: SBI, p. 169. 1996.

VAZZOLER, A.E.A.M. **Manual de métodos par estudos biológicos sobre populações de peixes: crescimento e reprodução**. Brasília, CNPq. Programa Nacional de Zoologia, 1981. p.108.

WATANABE, W.O. et al. Progress in controlled breeding of Nassau grouper (*Epinephelus striatus*) broodstock by hormone induction. **Aquaculture**, v.138, p.205-219, 1995.

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

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

YARON, Z. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. **Aquaculture**, v.129, p.49-73, 1995.

## ANEXOS

ANEXO A	Pág.
<b>TABELA 1A.</b> Resumo da análise de variância do peso da desova, em gramas e do índice gonadossomático (IGS) das fêmeas de curimba induzidas com diferentes tratamentos hormonais.....	<b>54</b>
<b>TABELA 2A.</b> Resumo da análise de variância do diâmetro médio, cinco horas e oito horas após a segunda aplicação hormonal das fêmeas de curimba induzidas com diferentes tratamentos hormonais.....	<b>54</b>
<b>TABELA 3A.</b> Resumo dos contrastes estudados para o posicionamento do núcleo dos ovócitos, cinco horas após a segunda aplicação hormonal, das fêmeas de curimba induzidas com diferentes tratamentos hormonais.....	<b>55</b>
<b>TABELA 4A.</b> Resumo dos contrastes estudados para o posicionamento do núcleo dos ovócitos, oito horas após a segunda aplicação hormonal, das fêmeas de curimba induzidas com diferentes tratamentos hormonais.....	<b>55</b>
<b>TABELA 5A.</b> Análise de correlação entre peso, diâmetro médio dos ovócitos cinco horas após a segunda aplicação hormonal, peso da desova e diâmetro médio dos ovócitos oito horas após a segunda aplicação hormonal, das fêmeas de curimba induzidas com diferentes tratamentos hormonais.....	<b>56</b>

**TABELA 1A.** Resumo da análise de variância do peso da desova, em gramas e do índice gonadossomático (IGS) das fêmeas de curimba induzidas com diferentes tratamentos hormonais.

Fonte de variação	gl	Quadrado médio (peso da desova)	Quadrado médio (IGS)
Hormônios	1	434,6031 ns	6,7745 ns
Erro	26	4835,8	23,8579
CV (%)		31,78	36,95

P > 0,05 = NS – não significativo

**TABELA 2A.** Resumo da análise de variância do diâmetro médio, cinco horas e oito horas após a segunda aplicação hormonal das fêmeas de curimba induzidas com diferentes tratamentos hormonais.

Fonte de variação	gl	Quadrado médio (cinco horas)	gl	Quadrado médio (oito horas)
Hormônios	2	0,0136 ns	2	0,0385 *
Erro	24	0,0384	29	0,0102
CV (%)		14,38		7,65

P > 0,05 = NS – não significativo, \* significativo.

**TABELA 3A.** Resumo dos contrastes estudados para o posicionamento do núcleo dos ovócitos, cinco horas após a segunda aplicação hormonal, das fêmeas de curimba induzidas com diferentes tratamentos hormonais.

Contrastes	gl	Chi-quadrado	Pr> Chi-quad.
A vs B	1	0,01	0,9326
A vs C	1	31,99	< 0,0001
B vs C	1	22,45	< 0,0001

**TABELA 4A.** Resumo dos contrastes estudados para o posicionamento do núcleo dos ovócitos, oito horas após a segunda aplicação hormonal, das fêmeas de curimba induzidas com diferentes tratamentos hormonais.

Contrastes	gl	Chi-quadrado	Pr> Chi-quad.
A vs B	1	14,33	0,0002
A vs C	1	89,27	< 0,0001
B vs C	1	30,05	< 0,0001

**TABELA 5A.** Análise de correlação entre peso, diâmetro médio dos ovócitos cinco horas após a segunda aplicação hormonal, peso da desova e diâmetro médio dos ovócitos oito horas após a segunda aplicação hormonal, das fêmeas de curimba induzidas com diferentes tratamentos hormonais.

Parâmetros	Coeficiente de correlação (significância)			
	Peso	Diâmetro antes	Peso desova	Diâmetro depois
Peso	1	-0,12916 <b>(0,5208)</b>	0,13836 <b>(0,4826)</b>	-0,08842 <b>(0,6303)</b>
		27	28	32
Diâmetro cinco horas	-0,12916 <b>(0,5208)</b>	1	0,36321 <b>(0,0885)</b>	0,23273 <b>(0,2427)</b>
		27	23	27
Peso desova	0,13836 <b>(0,4826)</b>	0,36321 <b>(0,0885)</b>	1	0,09755 <b>(0,6214)</b>
		28	23	28
Diâmetro oito horas	-0,08842 <b>(0,6303)</b>	0,23273 <b>(0,2427)</b>	0,09755 <b>(0,6214)</b>	1
		32	28	

<b>ANEXO B</b>	<b>Pág.</b>
<b>FIGURA 1B.</b> Resumo da análise de variância do volume e da concentração espermática do sêmen dos machos induzidos com diferentes tratamentos hormonais.....	<b>58</b>
<b>TABELA 2B.</b> Resumo da análise de variância da motilidade e da duração da motilidade espermática do sêmen dos machos induzidos com diferentes tratamentos hormonais.....	<b>58</b>
<b>FIGURA 3B.</b> Contrastes estudados para a proporção de espermatozóides com anormalidades, do sêmen dos machos induzidos com diferentes tratamentos hormonais.....	<b>59</b>
<b>TABELA 4B.</b> Análise de correlação entre peso, motilidade e duração espermática, volume e concentração do sêmen dos machos induzidos com diferentes tratamentos hormonais.....	<b>59</b>

**FIGURA 1B.** Resumo da análise de variância do volume e da concentração espermática do sêmen dos machos induzidos com diferentes tratamentos hormonais.

Fonte de variação	gl	Quadrado médio	
		Volume	Concentração
Hormônios	3	0,8478 ns	275,1236 ns
Erro	29	3,8672	198,2102
CV (%)		29,81	40,45

$P > 0,05 = \text{NS}$  – não significativo

**FIGURA 2B.** Resumo da análise de variância da motilidade e da duração da motilidade espermática do sêmen dos machos induzidos com diferentes tratamentos hormonais.

Fonte de variação	gl	Quadrado médio	
		Duração	Motilidade
Hormônios	3	26,7569 ns	0,00074 ns
Erro	29	191,6291	0,00092
CV (%)		25,22	3,09

$P > 0,05 = \text{NS}$  – não significativo

**FIGURA 3B.** Contrastes estudados para a proporção de espermatozoides com anormalidades, do sêmen dos machos induzidos com diferentes tratamentos hormonais.

Contrastes	gl	Chi-quadrado	Pr> Chi-quad.
A vs B	1	0,09	0,7634
A vs C	1	0,04	0,8501
A vs D	1	9,15	0,0025
B vs C	1	0,15	0,7021
B vs D	1	5,58	0,0182
C vs D	1	6,36	0,0117

**FIGURA 4B.** Análise de correlação entre peso, motilidade e duração espermática, volume e concentração do sêmen dos machos induzidos com diferentes tratamentos hormonais.

Parâmetros	Coeficiente de correlação (significância)				
	Peso	Motilidade	Duração	Volume	Concentração
Peso	1	0,04179 <b>(0,8174)</b>	-0,05902 <b>(0,7442)</b>	0,21330 <b>(0,2333)</b>	-0,06705 <b>(0,7108)</b>
Motilidade	0,04179 <b>(0,8174)</b>	1	0,02417 <b>(0,8938)</b>	0,17152 <b>(0,3399)</b>	0,20152 <b>(0,2608)</b>
Duração	-0,05902 <b>(0,7442)</b>	0,02417 <b>(0,8938)</b>	1	-0,14597 <b>(0,4176)</b>	-0,19750 <b>(0,2706)</b>
Volume	0,21330 <b>(0,2333)</b>	0,17152 <b>(0,3399)</b>	-0,14597 <b>(0,4176)</b>	1	0,01255 <b>(0,9447)</b>
Concentração	-0,06705 <b>(0,7108)</b>	0,20152 <b>(0,2608)</b>	-0,19750 <b>(0,2706)</b>	0,01255 <b>(0,9447)</b>	1

Pág.

**ANEXO C**

**FIGURA 1C.** Nomes populares e científicos de teleósteos citados neste trabalho. Adaptado de BALDISSEROTTO (2002)..... **61**

**FIGURA 1C.** Nomes populares e científicos de teleósteos citados neste trabalho. Adaptado de BALDISSEROTTO (2002).

<b>Nome científico</b>	<b>Nome comum</b>	<b>nome comum(em inglês)</b>
<i>Acipenser ruthenus</i>	esturjão	sterlet
<i>Anguilla anguilla</i>	enguia europeia	european eel
<i>Anguilla japonica</i>	enguia japonesa	japanese eel
<i>Bidyanus bidyanus</i>	perca	silver perch
<i>Brycon insignis</i>	piabanha	-
<i>Brycon opalinus</i>	pirapitinga-do-sul	-
<i>Brycon orbignyanus</i>	piracanjuba	-
<i>Brycon siebenthalae</i>	-	yamú
<i>Chondrostoma nasus</i>	-	nase
<i>Cyprinus carpio</i>	carpa comum	common carp
<i>Epinephelus striatus</i>	-	nassau
<i>Heterobranchus bidorsalis</i>	-	african giant catfish
<i>Heterobranchus longifilis</i>	-	catfish, vundu
<i>Leporinus macrocephalus</i>	piavuçu	-
<i>Leporinus obtusidens</i>	piapara	-
<i>Lutjanus campechanus</i>	-	red snapper
<i>Micropogonias furnieri</i>	corvina branca	white croaker
<i>Odontesthes bonariensis</i>	peixe-rei	silverside, pejerrey
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	truta arco-íris	rainbow trout
<i>Pagrus major</i>	-	red seabream
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	pacu	-
<i>Prochilodus lineatus</i>	curimba, curimatá	grumata
<i>Prochilodus scrofa</i>	curimbatá	-
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	cachara	brazilian catfish
<i>Scomber japonicus</i>	cavala	chub mackerel
<i>Silurus asotus</i>	-	catfish
<i>Stizostedion vitreum</i>	-	walleyes
<i>Takifugu ocellatus</i>	baiacu	puffer