



ESTEFÂNIA DE SOUZA ANDRADE

**PROTOCOLOS DE INDUÇÃO HORMONAL EM
LAMBARI (*Astyanax fasciatus*) e CURIMBA
(*Prochilodus lineatus*)**

LAVRAS-MG

2012

ESTEFÂNIA DE SOUZA ANDRADE

PROTOCOLOS DE INDUÇÃO HORMONAL EM LAMBARI

(*Astyanax fasciatus*) e CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)

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

Orientador

Dr. Luis David Solis Murgas

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Andrade, Estefânia de Souza.

Protocolos de indução hormonal em lambari (*Astyanax fasciatus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*) / Estefânia de Souza
Andrade. – Lavras : UFLA, 2012.

89 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Peixes de água doce. 2. Fêmeas. 3. Machos. 4. Reprodução induzida. 5. Horário de aplicação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.37520416

ESTEFÂNIA DE SOUZA ANDRADE

**PROCOLOS DE INDUÇÃO HORMONAL EM LAMBARI
(*Astyanax fasciatus*) e CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)**

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

APROVADA em 16 de julho de 2012.

Dra. Gláucia Frasnelli Mian	UFLA
Dra. Mônica Ferreira Rodrigues Machado	UFLA
Dr. Galileu Crovatto Veras	IECOS/UFPA
Dra. Cristina Delarete Drummond	UFLA

Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

LAVRAS-MG

2012

DEUS

**Eu não agradeço-Te somente por este dia,
mas sim Te agradeço por todos os dias da minha vida
pois, até aqui Tu me sustentaste e nunca
me abandonaste, por estar comigo em todas
as situações e pelo Teu grande amor...**

A minha mãe, Maria José, por todo apoio ao longo destes maravilhosos anos de existência;

Ao meu pai David que mesmo não estando presente sempre estará em meu coração;

As minhas irmãs, Juliana e Daniella, que sempre me apoiaram e incentivaram.

A todos aqueles que amo...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por fortalecer-me e ser meu alicerce diante de todas as dificuldades.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao departamento de Medicina Veterinária, pelo apoio;

Ao CNPQ, pela bolsa de estudo concedida;

Ao professor Luis David Solis Murgas, pela orientação e pela amizade demonstrada no decorrer deste trabalho;

Ao funcionário do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do DMV/UFLA, Willian César Cortez, por ser sempre prestativo e por possibilitar a realização deste projeto, o que foi essencial para a realização deste trabalho;

Ao Rafael Vilhena Reis Neto e Vítor Traboussi, pela colaboração;

À Daniella Aparecida de Jesus Paula, Mônica Ferreira Rodrigues Machado, Viviane de Oliveira Felizardo, Aline Ferreira Souza de Carvalho, Victor Ferreira Ribeiro Mansur, Galileu Crovato Veras que de colegas de trabalho se tornaram grandes amigos e foram imprescindíveis na coleta de dados deste trabalho.

Aos meus queridos amigos, Cristina, João Paulo, Suelen, Alexandre, Marcela, Carol, Tassa, Gláucia, Vinícius, Deila, Daniela, por terem passado em diferentes etapas da minha vida e sempre deixarem algo de bom.

Aos meus familiares, pelo apoio e ao Basílio, que se tornou parte da família;

Ao Lafa, que apesar de ter entrado na minha vida recentemente, me trouxe a calma e o apoio que precisava;

Àqueles que, embora não tendo sido nominalmente citados, estiveram presentes, às vezes de forma casual e/ou esporádica e, principalmente, afetiva...

Muito Obrigada!

RESUMO GERAL

Objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes indutores hormonais na reprodução de lambari (*Astyanax fasciatus*) e a influência do tempo de indução hormonal em fêmeas e machos de curimba (*Prochilodus lineatus*), utilizando gonadorelina e Extrato Bruto de Hipófise de Carpa (EBHC). No experimento I as fêmeas de lambari foram expostas a fotoperíodo e temperatura controlados. As dosagens hormonais constutiram os tratamentos: 6,0 mg/kg de EBHC; 0,25; 0,5; 0,75; 0,9 mL/kg de acetato de buserelina e 40; 60; 80; 100 µg/kg de gonadorelina. As variáveis avaliadas foram níveis de Hormônio Luteinizante (LH) e estradiol, índice gonadossomático (IGS), índice hepatossomático (IHS), número total de ovócitos produzidos por peixe, número de ovócitos em 0,1 g, diâmetro dos ovócitos (µm) e porcentagem de ovócitos com a vesícula germinativa na posição periférica (PPGV%). Foi utilizado um DIC sendo os dados analisados pela ANOVA. Foi realizada uma análise de variância em esquema hierárquico seguida de uma análise de regressão. O número total de ovócitos por fêmea e o número de ovócito em 0,1 g apresentou diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos. A análise de regressão das doses, em relação a PPGV% apresentou a dose ideal de gonadorelina de 57 µg/mL. O LH apresentou diferença ($P < 0,05$) entre o controle negativo e os tratamentos. No experimento II 16 casais de curimba foram induzidos com duas aplicações de EBHC ou gonadorelina em intervalo de 12 horas, que foram realizadas as 12:00 (ML) ou 24:00 (MD). Nas fêmeas o número de ovócitos/grama, o diâmetro (µm) e a PPGV% foram avaliadas. Nos machos foram avaliados, volume total do sêmen (mL), concentração, taxa e duração da motilidade espermática e morfologia. A taxa de fertilização e eclosão também foi avaliada. Os dados foram analisados utilizando o SAEG. Foi observada interação ($P < 0,05$) do hormônio e o período de aplicação sobre a variável de desova. Houve efeito ($P < 0,05$) do hormônio sobre o peso da desova, oócitos por grama e as horas graus. Nos machos, a utilização de EBHC promoveu maior volume seminal. Na aplicação hormonal realizada em MD, a utilização de EBHC apresentou maior duração da motilidade espermática. Somente os reprodutores que receberam a indução hormonal com EBHC apresentaram taxas de fertilização e eclosão. Conclui-se que na reprodução induzida do lambari, recomenda-se a utilização do hormônio gonadorelina na dose de 57 µg/mL, e que a gonadorelina nas doses utilizadas para curimba, não é eficiente para a obtenção de larvas viáveis, independentemente do horário de aplicação. Nesta espécie, o EBHC pode ser aplicado nos machos e nas fêmeas em ML ou MD, sem alterar a qualidade dos gametas.

Palavras-chave: Fêmeas, Horário de aplicação, Macho, Reprodução induzida.

ABSTRACT

This work aimed at evaluating the effects of different hormonal inductors on lambari (*Astyanax fasciatus*) reproduction and the influence of the period of the hormonal induction in male and female curimba (*Prochilodus lineatus*), using gonadorelin and Crude Carp Pituitary Extract (CCPE). In experiment I, the lambari females were exposed to controlled photo period and temperature. The treatments were constituted of the hormonal dosages: 6.0 mg/kg of CCPE; 0.25, 0.5, 0.75 and 0.9 mL/kg of buserelin acetate; and 40, 60, 80 and 100 μ m/kg of gonadorelin. The evaluated variables were: levels of Luteinizing Hormone (LH) and estradiol, gonadosomatic index (GSI), hepatosomatic index (HSI), total number of oocytes produced by fish, number of oocytes in 0.1 g, oocyte diameter (μ m) and percentage of oocytes with germinal vesicle in a peripheral position (GVPP%). A completely randomized design was used, with data analyzed by ANOVA. A variance analysis was performed in a hierarchic scheme followed by a regression analysis. The total number of oocytes per female and the number of oocytes in 0.1 g presented difference ($P < 0.05$) between the treatments. The regression analysis of the dosages, in relation to GVPP% presented an ideal dosage of gonadorelin of 57 μ g/mL. The LH presented difference between the negative control and the treatments. In experiment II, sixteen curimba pairs were induced with two applications of CCPE or gonadorelin in an interval of 12 hours, which were at 12:00 (HL) or 24:00 (HD). For the females, the number of oocytes/g, the diameter (μ m) and the GVPP% were evaluated. For the males, the total volume of semen (mL), concentration, spermatic motility rate and duration morphology were evaluated. The fertilization and hatching rates were also evaluated. The data were analyzed using SAEG. An interaction ($P < 0.05$) of the hormone and the application period was observed for the spawning variable. An effect of the hormone occurred ($P < 0.05$) over the spawning weight, oocytes/g and hours degree. For the males, the use of CCPE promoted larger semen volume. With the hormonal application at HD, the use of CCPE presented larger spermatic motility duration. Only the broodstock induced with CCPE presented fertilization and hatching rates. It is concluded that in lambari induced reproduction, the use of a 57 μ g/mL dose of gonadorelin hormone is recommended, and that gonadorelin in the dosages used for curimba are not efficient in the obtaining viable larvae, independently of the application period. For this species, the CCPE may be applied to males and females, in HL or HD, without altering the quality of the gametes.

Key-words: Females. Application period. Male. Induced reproduction.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 9
2	REFERENCIAL TEÓRICO 12
2.1	Importância da reprodução na aquicultura 12
2.2	Espécies estudadas 15
2.2.1	Lambari (<i>Astyanax fasciatus</i>) 15
2.2.2	Curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) 17
2.3	Mecanismos neuroendócrinos da reprodução de peixes 18
2.4	Indução hormonal em peixes nativos 23
2.4.1	Extrato Bruto de Hipófise de Carpa 24
2.4.2	Gonadorelinas: GnRH nativos e análogos 25
2.4.3	Análogos do GnRH [D-Ser⁶, Pro⁹ Net] LHRH (acetato de buserelina) e gonadorelina (aGnRH) 28
2.5	Fatores que influenciam a reprodução: ritmo biológico e temperatura 28
3	CONCLUSÃO 33
	REFERÊNCIAS 34
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS 43
	ARTIGO 1 Protocolos de indução hormonal em lambari (<i>Astyanax fasciatus</i>) submetido à ambiente controlado..... 43
	ARTIGO 2 Effect of different hormonal inducers and time of application about the reproduction of Curimba..... 64

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A expansão e o desenvolvimento tecnológico na piscicultura brasileira têm favorecido o desenvolvimento econômico do país e contribuído para a preservação e repovoamento de espécies nativas. O desaparecimento dos estoques naturais de peixes nativos está relacionado com os efeitos deletérios causados pela construção de hidroelétricas, pela urbanização e agricultura.

A reprodução segue padrões rítmicos determinados, os ritmos biológicos, que asseguram máxima eficiência de desenvolvimento das espécies. A influência dos ritmos biológicos, circadianos, infradianos e ultradianos no comportamento reprodutivo dos peixes é pouco conhecida, podendo alterar as respostas reprodutivas, determinando um aumento do número e qualidade de alevinos nascidos e crescimento destes indivíduos. O conhecimento desta influência poderia subsidiar respostas relacionadas à produção de peixes em cativeiro tais como a determinação do estado de maturação no momento da indução, a hora de aplicação do hormônio, o intervalo entre as aplicações, o período de latência, a variação estacional, as condições ambientais e as técnicas de manipulação dos reprodutores, pois hoje ainda são detalhes pouco determinados no processo de reprodução artificial de peixes nativos.

Neste aspecto, a utilização de técnicas de reprodução artificial, que consiste na indução hormonal da desova e da espermição, permite que os peixes completem seu ciclo reprodutivo no momento desejado e em condições controladas em cativeiro. A utilização do extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) é o método de indução artificial da reprodução de espécies de caráter reofílico mais utilizado nas estações de piscicultura. Porém este é proveniente de espécies *Cyprinus carpio*, as quais geralmente são importadas, possuindo

elevado custo, devido também a uma limitação imposta pelo Ministério da Agricultura (artigo 4º), no estado de Minas Gerais, proibindo o ingresso de qualquer produto, subprodutos, despojos de animais aquáticos, vísceras, alimento vivo ou qualquer outro material presumível veiculador de agente etiológico de doenças contagiosas.

Além disso, há a impossibilidade da reutilização do mesmo reprodutor quando utilizamos o EBHC em um mesmo ciclo da piracema, diferente do que ocorre com a utilização de análogos de GnRH onde, a não resposta do reprodutor à indução hormonal não inviabiliza outra aplicação hormonal na mesma piracema, devido a utilização de hormônio liberador de gonadotrofinas que estimula o animal a produzir sua própria gonadotrofina e caso isso não ocorra as gônadas continuaram com seus ovócitos em boas condições de utilização, fato que não ocorre quando aplicamos o hormônio gonadotrófico diretamente na corrente sanguínea.

No Brasil, a utilização de hormônios sintéticos ou purificados na reprodução artificial de peixes é inexpressiva em relação ao EBHC. Vários protocolos hormonais utilizando hormônios sintéticos ou agonistas de GnRH têm sido desenvolvidos, porém para peixes nativos brasileiros a padronização das técnicas de indução da reprodução ainda constitui um problema para os pesquisadores.

Desta forma, é necessário o aprimoramento de reprodução induzida, utilizando hormônios sintéticos como agonistas de GnRH (gonadorelina) e GnRH sintético (acetato de buserelina) nas espécies nativas a fim de suprir as necessidades que estes peixes exigem para obtenção de maiores números de larvas e alevinos de boa qualidade.

Diante disto, este trabalho teve como objetivos: avaliar os efeitos de diferentes protocolos de indução hormonal na reprodução induzida de lambari previamente submetido à ambiente controlado e determinar os parâmetros

reprodutivos de fêmeas e machos de curimba (*Prochilodus lineatus*) induzidos hormonalmente com gonadorelina e Extrato Bruto de Hipófise de Carpa em diferentes momentos de aplicação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da reprodução na aquicultura

Devido à crescente demanda por alimento, fez-se necessário e mesmo imperativo que se encontrasse alternativas para formas de cultivo de peixes que complementassem a produção natural e que tivessem capacidade de saciar a demanda mundial de pescado, buscando também a sustentabilidade econômica e ambiental. Neste caso, foi necessário desenvolver tecnologia para produção em grande escala de peixes cultivados em águas interiores e no mar. Assim, hoje no mundo todo, um grande número de espécies de água doce e salgada é cultivado em diferentes sistemas de produção e níveis tecnológicos (ANDRADE; YASUI, 2003).

Dentre os vários setores da produção animal brasileira, a piscicultura vem destacando-se de forma bastante significativa, sendo o que mais cresce atualmente, com índice entre 10 e 30% (OSTRENSKY; BOEGER, 1998), e hoje já partimos para uma escala industrial de produção de pescado cultivado. Esse grande crescimento é devido principalmente à aptidão do país para este tipo de atividade, do clima adequado, da grande disponibilidade de água e o grande número de espécies de peixes nativos potencialmente cultiváveis (GOMES et al., 2000).

Como se sabe, o sucesso da piscicultura depende da capacidade da perpetuação da espécie, onde são produzidas larvas a serem utilizadas na criação, visando à terminação ou a manutenção do plantel de reprodutores. Desta forma, a piscicultura, no nosso país, somente teve possibilidade de se expandir no momento em que as técnicas de reprodução natural e artificial de peixes em cativeiro se consolidaram (SHEPHERD; BROMAGE, 1988).

O Brasil despertou para o seu potencial em termos de produção aquícola e atravessa um período de profissionalização desta atividade voltada agora para a industrialização. Este momento ressalta a importância da organização da produção em função do volume necessário para comercialização e exportação em grande escala. Isto nos leva a necessidade de cada vez mais produzir alevinos e aprimorar nossa tecnologia de reprodução natural e artificial de peixes (ANDRADE; YASUI, 2003).

Muitas das técnicas reprodutivas ainda estão sendo descobertas para diversas espécies em cultivo no país, fazendo com que os principais pacotes tecnológicos voltados para a reprodução de peixes ainda sejam aqueles encontrados em espécies exóticas (ANDRADE; YASUI, 2003).

Todo o processo de indução hormonal começou com Rodolpho Von Ihering, que iniciou os trabalhos de cultivo de peixes na região nordeste em 1932. Havia o interesse de expandir a piscicultura, mas, a dificuldade de obtenção de alevinos era grande, haja vista a impossibilidade de reprodução natural das várias espécies de peixes em cativeiro (PILLAY, 1995).

Nos dias atuais, existem diversas alternativas para a indução reprodutiva em peixes, sendo que a maioria das técnicas atuam através da aplicação de substâncias que irão desencadear estímulos na hipófise desses animais, utilizando hormônios naturais ou sintéticos, como é o caso de análogos de GnRH, inibidores de dopamina, domperidona, pimizida e metoclopramida. A indução pode ainda atuar em nível gonadal, como é o caso de gonadotropinas de peixes, macerado de hipófises desidratadas e gonadotropina coriônica humana.

Todas essas técnicas são realizadas a fim de que seja possível induzir a ovulação e espermição de algumas espécies de peixes com potencial para ser utilizadas em pisciculturas (COWARD et al., 2002). As induções químicas, podem ainda ser utilizadas para aumentar a produção seminal, antecipar o período reprodutivo, restringi-lo ou mesmo sincronizar a reprodução de um lote

de matrizes, o que permite ao produtor obter alevinos em períodos onde a lucratividade seja maior, ou que o cultivo seja finalizado em período onde a comercialização seja beneficiada (VENTURIERI; BERNARDINO, 1999).

Alguns grupos de peixes reproduzem-se naturalmente em águas lânticas, outros, que abrange a maioria das espécies nativas, como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), curimba (*Prochilodus lineatus*), dourado (*Salminus brasiliensis*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), piraputanga (*Brycon microlepis*) e piracanjuba (*Brycon orbignianus*), necessitam realizar migrações rumo às cabeceiras dos rios para a reprodução, peixes estes de grande importância para a piscicultura (VENTURIERI; BERNARDINO, 1999).

Para estas espécies, que em cativeiro não se reproduzem naturalmente, necessita-se da reprodução induzida a fim de que seja possível a obtenção de larvas para posterior cultivo, da mesma forma, apesar do grupo de peixes que se reproduzem em águas lânticas dispensarem a indução hormonal para que ocorra a desova, as técnicas de reprodução artificial são utilizadas para sincronizar a reprodução, ter maior controle sobre os reprodutores e a desova, bem como manipular o período reprodutivo, fatores estes muito importantes no cenário na produção comercial (ANDRADE; YASUI, 2003).

Atualmente, a demanda por alevinos no cenário nacional estimulou o desenvolvimento da aquicultura que por sua vez ao produzir uma maior oferta de peixes estimulou o consumo e aumentou a demanda. Este desenvolvimento da atividade aquícola trouxe consigo todo o acompanhamento representado pelos insumos, equipamentos, e vias de comercialização gerando renda e produzindo empregos (CAMARGO; POUÉY, 2005).

Hoje o mercado se abre e força à especialização, o profissionalismo e a organização da atividade aquícola em sistemas de produção e comercialização compatíveis com as exigências do mercado interno e externo. Assim, justifica-se

a reprodução induzida, para a obtenção de uma produção em massa de larvas, com alta taxa de sobrevivência para o abastecimento dos sistemas de criação de espécies reofílicas (QUEIROZ et al., 2000).

2.2 Espécies estudadas

Neste trabalho foram utilizadas duas espécies importantes da bacia do Rio Grande, o lambari (*Astyanax fasciatus*) e o curimba (*Prochilodus lineatus*), das quais suas principais características seguem abaixo.

2.2.1 Lambari (*Astyanax fasciatus*)

O lambari, *Astyanax fasciatus*, pertence à família Characidae, que engloba a maior parte dos peixes de água doce do Brasil e a subfamília Tetragonopterinae, que possui o maior número de espécies (OYAKAWA et al., 2006), existindo no Brasil cerca de 34 espécies. Os mais importantes deste gênero são os lambaris-de-rabo-vermelho *A. fasciatus* e os lambaris do-rabo-amarelo *A. bimaculatus* (ARAÚJO; SIMONI, 1997), conhecidos também por tambuí, piabas no Nordeste e matupiris no Norte. Possuem distribuição desde o sul dos Estados Unidos até a bacia do Prata, e apresentam uma importância relevante, dado o seu volume de captura e destaque na pesca esportiva (BARBIERI; SANTOS; SANTOS, 1982).

O lambari do rabo vermelho *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) é uma espécie exclusivamente de água doce, bentopelágica e de ampla distribuição (LIMA et al., 2003), constituindo um importante item alimentar de espécies piscívoras (CÂMARA et al., 1991).

Pesquisas relacionadas à reprodução e alimentação desta espécie, mostraram que *A. fasciatus* tem desova parcelada e que sua maior atividade

reprodutiva ocorre entre os meses de setembro a abril (BARBIERI; HARTZ; VERANI, 1996; GURGEL, 2004), apresentando comportamento alimentar onívoro, com uma tendência insetívora (AGOSTINHO; HAHN; MARQUES, 2003; SILVEIRA-VILELLA; BECKER; HARTZ, 2002).

Entre as diversas espécies nativas com potencial para piscicultura, esta possui um mercado específico, porém com possibilidades de expansão, se destacando pela fácil aceitação de alimentação artificial, além de apresentar alta proliferação, ciclo curto de produção, ser bem aceito como petisco e bastante procurado como isca para a pesca esportiva (FAIRCHILD; HOWELL, 2001). Em cultivo, já possui algumas pesquisas sobre alguns aspectos de sua criação (HAYASHI; BOSCOLO; SOARES, 1999; SOARES; DURIGON; BERSANO, 1999; VILELA; HAYASHI, 2001).

Atualmente, a técnica de reprodução induzida para a produção de alevinos de algumas espécies, importantes comercialmente, como carpa e tilápia são totalmente dominadas e o número de produtores é elevado, sendo comercializados por valores mais baixos, já no caso dos lambaris e trairões, em que a demanda ainda não é totalmente suprida pelos produtores de alevinos, os valores de comercialização são mais elevados, justificando o estudo e melhoramento das técnicas reprodutivas destas espécies.

O lambari também é muito utilizado como um indicador ambiental (LÓPEZ; MIQUELARENA, 2005) devido a sua resistência a mudanças bruscas, com grande tolerância a sólidos dissolvidos totais, temperatura e pH da água (MENNI; GOMEZ; LÓPEZ-ARMENGOL, 1996). No Brasil, essa característica o levou a ser considerado como um bioindicador da contaminação da água e, devido a todos esses fatores, são de grande importância em estudos em laboratórios (SCHULZ; MARTINS JÚNIOR, 2000).

2.2.2 Curimba (*Prochilodus lineatus*)

O curimba *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), conhecido também pelo nome de curimbatá, grumatã ou papa-terra, é uma espécie de peixe de desova total, fecundação externa e sem cuidado parental. Pertencente à ordem characiformes sendo endêmico das bacias formadas pelos rios Paraná e Paraguai (FREITAS; FREATO; SANTOS, 2002).

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 (COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS; FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS - CEMIG; CETEC, 2000).

É encontrado no leito dos rios durante a época seca, nos trechos de águas mais calmas e seu hábito alimentar é iliófago, alimentando-se de detritos orgânicos, fauna bentônica e rações. Como é um peixe migrador, não se reproduz em ambientes lênticos, a menos que induzido hormonalmente (FREITAS; FREATO; SANTOS, 2002). Seu período reprodutivo inicia-se na primavera e tem seu pico no verão. É uma espécie com prolificidade, de 500.000 a 1.200.000 óvulos por desova (SANTOS, 1981).

Dentre diversas espécies nativas cultivadas no Brasil, o curimba (*Prochilodus lineatus*) tem-se destacado por seu potencial para a piscicultura sendo, atualmente, uma das mais produzidas (GALDIOLI et al., 2000). Os ovos, larvas, alevinos e os adultos são importantes alimentos de muitas espécies de

peixes predadores, sendo utilizados em sistemas de consorciação com outras espécies (MURGAS et al., 2003), e em policultivos no sul do país.

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; KULLANDER; FERRARI JÚNIOR, 2003). Pode ser utilizado para a obtenção de farinha de peixe, azeite para cosméticos e para curtir couros.

De acordo com 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 aquicultura continental brasileira, juntamente com a tilápia, carpa (*Cyprinus carpio*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*).

2.3 Mecanismos neuroendócrinos da reprodução de peixes

O controle dos processos reprodutivos na aquicultura comercial é indispensável para o sucesso da atividade. 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, como fatores ambientais e feromônios, e internos percebidos pelos peixes. Ele inicia a cascata hormonal e fisiológica ligada à reprodução, por meio da estimulação da produção e liberação dos hormônios liberadores de gonadotropina (GnRH) e dopamina, que quando

caem na corrente sanguínea atua diretamente na hipófise controlando a liberação e síntese das gonadotrofinas. Estas são de grande importância prática na reprodução induzida em peixes desempenhando papel fundamental no desenvolvimento gonadal (MYLONAS; FOSTIER; ZANUY, 2010).

O GnRH é um decapeptídeo e encontra-se presente em diversas espécies de invertebrados, incluindo os peixes teleósteos, podendo existir diversas formas de variantes moleculares (CAROLSFELD et al., 2000), sendo que as mais encontradas nos peixes incluem o GnRH-II (galinha) e o s- GnRH (salmão) (KLAUSEN et al., 2008). Vários estudos, tem demonstrado a presença de pelo menos 23 formas moleculares de GnRH identificadas em vários vertebrados e espécies protocordadas (MILLAR et al., 2004), sendo que a diferença molecular encontrada entre as formas é de apenas um a três aminoácidos (YAMAMOTO, 2003).

Essas diferentes formas apresentam diferentes potenciais de estimulação da hipófise para a síntese e liberação do hormônio foliculo estimulante (FSH ou GtH-I) e do hormônio luteinizante (LH ou GtH-II). Estudos comprovam que diferentes formas moleculares de GnRH podem induzir a ativação de diferentes sinalizações moleculares, e conseqüentemente, causar variação na resposta celular estimulada (CAUNT et al., 2006; KLAUSEN et al., 2008).

Na maioria dos peixes teleósteos, a distribuição do GnRH nos gonadotrófos da hipófise se dá por inervação direta, o que permite o controle neural das funções da hipófise (REDDING; PATINO, 1993). Mas em alguns peixes essa ligação é uma exceção, pois ocorre a presença do sistema porta hipotálamo-hipofisário.

Dentre os diferentes estimuladores das gonadorelinas, as diferentes formas do GnRH são consideradas como sendo os mais importantes. O controle do desenvolvimento e maturação gonadal é realizado pelo GtH que tem sua síntese estimulada pelo GnRH (AMANO et al., 1994). Segundo Klausen et al.

(2008), além da liberação das GtH's I e II, as formas sGnRH e cGnRH também estimulam a síntese e liberação do hormônio do crescimento (GH) e do hormônio estimulante da tireoide (TSH) pela pituitária. A sincronia entre os picos de GtH-II e GH em períodos pré ovulatórios é frequente e regulada por um mecanismo neuroendócrino multifatorial, em que o GnRH é um dos fatores influentes (PETER; YU, 1997).

O TSH tem função de estimular a tireoide a produzir T3 e T4 que leva a liberação de IGF-I potencializando o efeito das gonadotrofinas no início do desenvolvimento ovariano. Da mesma forma, o GH estimula a liberação de esteroides nos testículos e nos ovários, mas tem uma potência menor que as GtH I e II, além de promover o estímulo direto da produção de IGF I e II pelo fígado (BALDISSEROTTO, 2009).

As gonadotrofinas GtH-I e GtH-II são hormônios glicoproteicos que estão diretamente envolvidos no processo de produção de gametas pelas gônadas. A síntese e a liberação de gonadotrofinas pela hipófise é estimulada pelo GnRH e inibida pela dopamina. As gonadotrofinas hipofisárias são transportadas via plasma sanguíneo até as gônadas, onde irão estimular a gametogênese (produção de espermatozóides e ovócitos) e a esteroidogênese (esteroides sexuais) pelo testículo e ovário. Esteroides sexuais e outros fatores gonadais exercem um controle de resposta positivo e negativo no hipotálamo, hipófise, e na própria gônada (SALLUM, 2002).

Segundo Mylonas et al. (1996), o GtH-I está envolvido nas fases iniciais da gametogênese (vitelogênese e espermatogênese), e o GtH-II na espermiogênese, espermição e na maturação final dos ovócitos promovendo a competência maturacional do ovócito, deixando-o sensível a progesterona. Sob a ação das diferentes gonadotrofinas, as gônadas produzem os chamados esteroides sexuais. Esses hormônios podem estar ligados a outras substâncias e

permanecerem inativos, mas prontos para serem ativados ou funcionarem como ferormônios antes e durante a desova (GINNEKEN; MAES, 2005).

Nos machos os processos de espermatogênese e formação do sêmen parecem estar sob o controle da testosterona e da 11-cetotestosterona. A 11-cetotestosterona estimula as células de Sertoli a produzirem activina, ao qual juntamente com este hormônio estimulam a proliferação das espermatogônias. No fim da espermatogênese há uma diminuição dos níveis de GtH-I e 11-cetotestosterona e um aumento do GtH-II e hidroxiprogesterona que é essencial para maturação do esperma e espermição (MIURA; MIURA, 2003) (Figura 1).

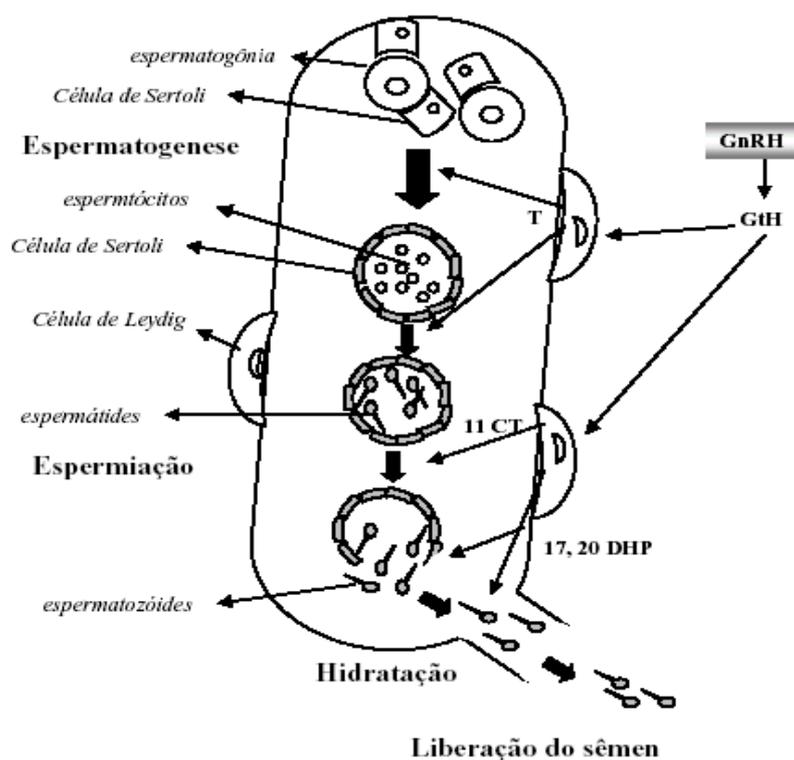


Figura 1 Maturação do ovócito no ovário de peixe e seu controle hormonal
Fonte: Pereira (2006).

Nas fêmeas o GtH-II estimula o crescimento ovocitário e vitelogênese, aumentando a liberação ovariana de estradiol, o qual estimula a produção hepática de vitelogenina. O GtH-II é importante para a maturação do ovócito, pois estimula a produção de progesterona a qual induz a migração e quebra da vesícula germinal. A progesterona também estimula a ovulação, que é a liberação do ovócito de dentro do folículo ovariano, diretamente em algumas espécies e, em outras, estimula a liberação de prostaglandina F pelos ovários e esta substância promove a desova, que é a liberação do ovócito para o meio externo (BALDISSEROTTO, 2009) (Figura 2).

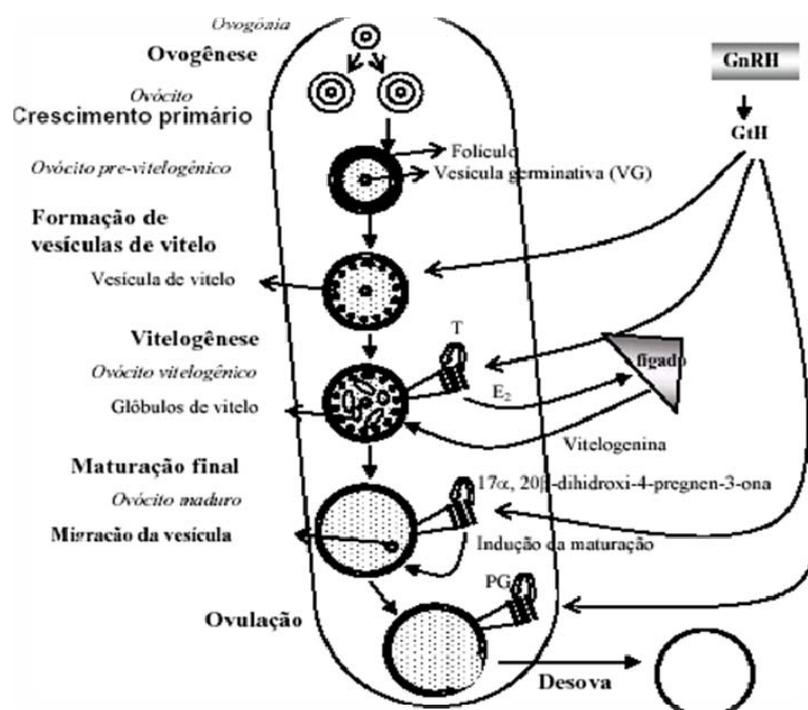


Figura 2 Maturação do ovócito no ovário de peixe e seu controle hormonal
Fonte: Pereira (2006).

2.4 Indução hormonal em peixes nativos

Existem dois grupos de espécies de peixes quando se estuda o comportamento reprodutivo, sendo que, a maioria das espécies nativas brasileiras está incluída nas espécies chamadas reofílicas ou migradoras, que para se reproduzirem necessitam se deslocar por grandes distâncias em direção às cabeceiras dos rios, afetando toda sua fisiologia, o que irá desencadear processos essenciais para o preparo da reprodução. Em um segundo grupo encontra-se os chamados não-migradores, que se reproduzem naturalmente em águas lênticas (VENTURIERI; BERNARDINO, 1999).

Nos viveiros de piscicultura, a privação desse comportamento migratório, no grupo de espécies reofílicas, impede que esses peixes atinjam o preparo fisiológico para a reprodução. Com isso, se faz necessário a indução hormonal nestes animais (MURGAS et al., 2003). Porém, no grupo de peixes que se reproduzem em águas lênticas, apesar destes dispensarem a indução hormonal para que ocorra a desova, as técnicas de reprodução artificial são utilizadas para sincronizar a reprodução, obtendo maior controle sobre os reprodutores e a desova, sendo possível desta forma manipular o período reprodutivo em cativeiro (ANDRADE; YASUI, 2003).

Desta forma, atualmente em cativeiro faz-se necessário algum tipo de indução hormonal para controlar ou estimular a reprodução de diversas espécies. Apesar de diferentes técnicas de manipulação hormonal ser empregadas atualmente com sucesso, alguns problemas têm sido evidenciados como o fato de o animal estar em estágio de desenvolvimento gonadal avançado e as múltiplas aplicações necessárias para atingir o sucesso na reprodução (ZOAR; MYLONAS, 2001).

Técnicas de indução hormonal utilizando hormônios sintéticos têm como objetivo manipular a espermiacção e maturação oocitária minimizando o

manejo e o estresse do animal, diminuindo o tempo de maturação e ovulação, e consequentemente as perdas devido à mortalidade pré-ovulação (ZOHAR; MYLONAS, 2001).

Mas apesar de necessária esta técnica pode apresentar, em algumas espécies de peixes, problemas que levam a disfunções do processo reprodutivo como, reduzida capacidade de realizar a espermatogênese e espermição dos machos, ausência de vitelogênese e maturação final dos ovócitos em fêmeas, podendo levar a uma queda na produção de sêmen e ovócitos além da baixa qualidade desses gametas (ZOHAR; MYLONAS, 2001).

2.4.1 Extrato Bruto de Hipófise de Carpa

Por muito tempo a técnica mais comumente usada para a propagação artificial de peixes foi a hipofisação (WOYNAROVICH, 1989), sendo este o método de indução artificial da reprodução de espécies de caráter reofílico mais estudado e utilizado nas estações de piscicultura, inclusive entre os piscicultores (SALLUM, 2002). Porém, com a introdução de novas leis, no estado de Minas Gerais, através da limitação imposta pelo Ministério da Agricultura (artigo 4º e 5º), proibindo o ingresso de qualquer produto, subprodutos, despojos de animais aquáticos, vísceras, alimento vivo ou qualquer outro material presumível veiculador de agente etiológico de doenças contagiosas, restringindo assim a utilização do EBHC apenas a estudos científicos, sendo necessária a utilização de novos hormônios nos protocolos utilizados.

O uso de EBHC apresenta vantagens e desvantagens, segundo Donaldson e Hunter (1983) e Streit Junior et al. (2003), o método de hipofisação é simples, requer pouco material hipofisário para manipulação, não é necessário resfriar o material preparado, além do cálculo da dosagem ser baseado em uma relação entre o peso corporal do receptor do extrato de hipófise e do hormônio

utilizado. Os mesmos autores ainda mencionaram que a presença de outros hormônios no extrato de hipófise pode ter um efeito sinérgico na indução.

Porém, esses autores citaram que o método de hipofiseção possui algumas desvantagens como, duas hipófises de mesmo peso podem ter quantidades diferentes de hormônios, a matriz receptora pode desenvolver reação imune à gonadotrofina da espécie doadora e há a possibilidade de hipófises frescas transmitirem doenças para as espécies receptoras.

2.4.2 Gonadorelinas: GnRH nativos e análogos

Inicialmente os estudos das gonadotrofinas foram bem intensos, contudo, nas últimas décadas, diversos pesquisadores concentraram os estudos na utilização do GnRH, pois ele é responsável pela estimulação da liberação do FSH e LH pela hipófise dos animais. Estes hormônios são responsáveis pela indução da maturação dos gametas, da ovulação e da espermição em peixes (HARVEY; CAROLSFELD, 1993). Atualmente tem se utilizado GnRH-a (análogo do GnRH), mGnRH-a (análogo do GnRH de mamífero) e sGnRH-a (análogo do GnRH de salmão), sendo estes hormônios sintéticos (CHANG et al., 2009).

O GnRH, são pequenos decapeptídeos, que atua no início da cadeia hormonal e estimula o peixe a sintetizar a sua própria gonadotrofina, eliminando assim os problemas relacionados a utilização de gonadotrofina de outras espécies. Também são capazes de atuar em uma molécula que não é espécie-específica, sendo suas estruturas simples e facilmente fabricadas, apresentando grande estabilidade estrutural, sendo muito efetivas utilizando pequenas dosagens de aplicação, sendo seu uso economicamente vantajoso (HARVEY; CAROLSFELD, 1993).

Foi observado também, que este hormônio por atuar em altos níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, proporciona uma estimulação mais balanceada dos eventos reprodutivos e possivelmente uma maior integração com outras funções fisiológicas, que direta ou indiretamente afetam os processos endócrinos da reprodução quando comparado ao EBHC. Além disso, os GnRHa por serem sintéticos, aparentemente são incapazes de desencadear resposta imune e transmissão de doenças aos reprodutores, perigo este sempre associado ao uso do EBHC (ZOAR; MYLONAS, 2001).

Para indução hormonal podem ser utilizadas as formas sintéticas ou nativas de GnRH. As formas sintéticas são desenvolvidas a fim de melhorar a sua resistência na circulação sanguínea contra a degradação enzimática e aumentar o tempo na corrente sanguínea em comparação com as formas nativas (ZOAR; MYLONAS, 2001). Sendo que a forma sintética GnRHa leva em torno de vinte e três minutos para ser degradada, enquanto que a forma nativa sGnRH se degrada em torno de cinco minutos.

Segundo Tan-Fermin et al. (1997), esse tempo reduzido de resistência do GnRH na corrente sanguínea pode certamente justificar falhas na indução hormonal em protocolos que utilizam apenas uma aplicação, o que possivelmente não induz ao aumento dos níveis de LH. Além disso, a maturação final dos ovócitos não é alcançada imediatamente após a aplicação do GnRH, pois é necessário que altos níveis, deste hormônio, sejam mantidos neste período para garantir a liberação adequada das gonadotrofinas, sendo este fator dependente da espécie e do estágio gonadal a qual esta se encontra, apresentando melhores resultados dentro do período reprodutivo (MYLONAS; ZOAR, 2001).

A explicação para a impossibilidade de induzir a maturação final e desova em várias espécies, com GnRH-a de mamífero ou de salmão, pode estar relacionada com os tipos de GnRH presentes nas espécies desse gênero (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007). Nesse sentido, diversos

experimentos têm focado o emprego de múltiplas aplicações hormonais. A comparação dos resultados obtidos com a utilização do [D-Ala6, Pro9 NET] LHRH e com o extrato de hipófise, na indução da carpa capim (*Ctenopharingodon idella*), relevou que a taxa de mortalidade dos reprodutores é menor quando se utiliza o análogo (DONALDSON; HUNTER, 1983) e, com *Piaractus mesopotamicus*, foi verificada a produção qualitativa e quantitativamente semelhante dos gametas, porém, com o custo 4,5 vezes menor quando o análogo foi utilizado (ZANIBONI FILHO, 1995).

Análogos do hormônio liberador de Luteinizantes des Gly10 (D-Ala6) etilamida de LHRH (LHRHa) tem sido utilizado com sucesso para induzir a maturação final e sincronizar a ovulação de muitas espécies cultivadas comercialmente (DONALDSON; HUNTER, 1983; MYLONAS; FOSTIER; ZANUY, 2010; PARK et al., 1997;. No início dos estudos com análogos sintéticos de GnRH, as doses eficazes utilizadas para induzir a ovulação em peixes variou de 1 a 15 mg / kg de peso corporal (DONALDSON; HUNTER, 1983; ZOHAR; MYLONAS, 2001). Na maioria dos relatos científicos sobre a reprodução de peixes publicados na década de 1980, as doses de análogos do GnRH variou de 50 a 100 µg / kg de peso corporal. Atualmente, recomendam-se doses variando entre 10 e 50 µg / kg de peso corporal, dependendo das espécies de peixes, do análogo e do modo de administração (ZOHAR et al., 2010; ZOHAR; MYLONAS, 2001). No entanto, injeção de GnRHa nem sempre resulta em ovulação de 100% (ZOHAR et al., 1995).

Atualmente, manipulações hormonais da reprodução utilizando um antagonista de análogo de GnRH combinado com tratamento antidopaminérgico são utilizadas principalmente em ciprinídeos (MIKOLAJCZYK et al., 2002, 2004; YARON, 1995), bagres (SILVERSTEIN et al., 1999) e tainha (AIZEN et al., 2005; ARABACI; DILER; SARI, 2004).

2.4.3 Análogos do GnRH [D-Ser⁶, Pro⁹ Net] LHRH (acetato de buserelina) e gonadorelina (aGnRH)

O análogo do GnRH (acetato de buserelina), vem sendo testado para a indução hormonal em peixes e trata-se de um nonapeptídeo, porém apresenta a serina inserida na posição dextro em substituição ao sexto peptídeo. Este hormônio foi utilizado com sucesso na indução à maturação final e desova de peixes migradores brasileiros (MÉNDEZ; RODRIGUEZ, 1989), há necessidade de mais trabalhos para definição da dose ideal a ser utilizada em cada espécie. A resposta a este hormônio pode variar de 1 a 4 dias e, geralmente, duas doses menores são melhores do que a soma das duas em uma única aplicação (BALDISSEROTTO, 2009). Segundo este mesmo autor a resposta ao GnRH ou seus análogos varia conforme a temperatura da água em que os reprodutores são mantidos, pois em temperaturas baixas aumenta-se o período de liberação dos gametas comprometendo assim a qualidade da desova.

A gonadorelina (aGnRH) é um hormônio que tem sido utilizado na indução hormonal em peixes. Em um trabalho pioneiro com esta substância para peixes realizado com *Astyanax bimaculatus*, Felizardo et al. (2012), observou que para esta espécie a gonadorelina foi eficiente para induzir a desova em fêmeas.

2.5 Fatores que influenciam a reprodução: ritmo biológico e temperatura

Os movimentos de rotação e translação da terra fazem com que os organismos que nela habitam sejam submetidos a mudanças cíclicas dos fatores ambientais. Todas as formas de vida respondem aos ciclos do sol, da lua ou circalunares, das marés, ou circamarés e das estações circanuais ou sazonais, sendo denominados de relógio biológico ou ritmo circadiano. Os animais são

governados com um ciclo que é correspondente ao tempo de uma rotação terrestre. Cada ciclo de 24 horas influencia uma função do organismo: temperatura, níveis hormonais, ritmo cardíaco, pressão arterial e até mesmo sensibilidade à dor (DOUGLAS, 2006).

Através da observação desses fatores biológicos que aconteciam de forma constante e cíclica, surgiu uma ciência denominada cronobiologia, que estuda os ritmos circadianos, infradianos e ultradianos e os fenômenos físicos e bioquímicos periódicos que ocorrem nos seres vivos (OLIVEIRA et al., 2009).

Um dos mecanismos que permite a sincronização do ambiente com o metabolismo corporal são os relógios biológicos, um mecanismo intracelular organizado que prepara os organismos de acordo com eventos/estímulos ambientais no intuito de manter a homeostasia corporal (TOSINI et al., 2008). Apesar disso, vale ressaltar, que nem sempre os relógios biológicos estão em sincronia com os ciclos ambientais.

O ritmo circadiano designa-se pelo período de aproximadamente um dia (24 horas) sobre o qual se baseia todo o ciclo biológico do indivíduo influenciado pela luz solar, influenciando os ritmos fisiológicos, que atuam sobre processos como a digestão, o estado de vigília, crescimento e renovação das células. O ritmo ultradiano inclui variações ocorridas em curtos períodos de tempo, por exemplo a frequência cardíaca. O ritmo infradiano caracteriza as variações que correm num período superior a vinte e oito horas (OLIVEIRA et al., 2009).

Todos esses fenômenos biológicos são processados e monitorados por um componente chave do sistema circadiano dos vertebrados que é o órgão da Este é responsável pela transdução de sinais ambientais (como luz e escuro) num sinal hormonal, a melatonina, que é produzido em quantidades elevadas durante a noite e imediatamente secretada para o corrente sanguínea (FALCÓN et al., 2007). Nos mamíferos, este órgão perdeu a sua capacidade fotossensível e o

ritmo circadiano é controlado por uma área do cérebro que se encontra localizada no hipotálamo, denominado núcleo supraquiasmático (SCN). Nos peixes, o relógio circadiano parece estar localizado no órgão pineal, uma vez que este tecido mantém a sua capacidade fotossensível e apresenta uma oscilação auto-sustentável (EKSTRÖM; MEISSL, 1997; IIGO et al., 1994).

Essas variações periódicas externas que são utilizadas pelos animais para ajustar seu relógio interno e seus ritmos biológicos são denominadas sincronizadoras ("zeitgebers"), que podem ser classificados em dois tipos: fatores abióticos e bióticos. Entre os fatores abióticos, a luz e os ciclos de temperatura são os principais sincronizadores do ritmo diário de comportamento e de expressão de genes relógio e tem um papel crucial nos ritmos estacionais, como a reprodução de peixes (BROMAGE; PORTER; RANDALL, 2001).

Quando se trabalha com indução reprodutiva em peixes um fator importante a ser observado é o horário da aplicação hormonal, pois em peixes teleósteos a ovulação e a desova tendem a ocorrer em determinadas horas do dia, por causa da influência fotoperiódica (SHERWOOD, 1983). Assim, pode-se considerar o horário da aplicação hormonal, um dos mais importantes no controle da reprodução induzida. Sendo necessários estudos, pois os picos de gonadotropina maturacional plasmática (GtHm) entre espécies de peixes variam de acordo com a hora do dia (ZANUY; CARRILLO, 1987).

Dentro desses fatores abióticos que controlam o relógio biológico dos seres vivos podemos destacar a temperatura. Como ectotérmicos os peixes são geralmente mais ativos quando as temperaturas são mais altas e se encontram dentro dos limites de tolerância da espécie (LUCAS; BARAS, 2001). Este fator pode modular a ação de hormônios em todos os níveis de controle reprodutivo, especialmente na ovulação e desova.

Algumas espécies de peixes de clima temperado e com alto valor econômico foram, desde a década de 70, testadas nas mais diversas condições de

temperatura com o intuito de se estabelecer condições ambientais apropriadas para a manutenção dos reprodutores adultos. Estes estudos consistiam basicamente na manutenção dos animais e verificações quantitativas e qualitativas do sucesso da gametogênese (taxa de crescimento ovariano e perfil hormonal) e ovulação (número de ovos, taxa de fertilização), processos intimamente relacionados ao sucesso reprodutivo de uma espécie (RIBEIRO; MOREIRA, 2012).

Sabe-se que a eficiência da indução hormonal pode depender em grande parte da temperatura da água. Dentro do intervalo de temperaturas fisiológicas, que são temperaturas ideais para os processos biológicos, temperaturas mais elevadas geralmente aceleram a reprodução sem qualquer efeito adverso. Fora deste intervalo, a alta temperatura é desfavorável e pode afetar o sucesso de desova e a qualidade da progênie (MYLONAS; FOSTIER; ZANUY, 2010).

Assim, alguns estudos foram realizados em relação a temperatura da água e suas influências sobre a reprodução afim de proporcionar informações da criação de espécies em cativeiro. Na maioria das espécies, a temperatura é o fator determinante sobre a reprodução, exercendo seus efeitos através de uma ação direta na gametogênese, na secreção de gonadotrofinas, na eliminação metabólica de hormônios, na resposta a ação de estrógenos sobre a produção de vitelogenina pelo fígado e na resposta das gônadas a estimulação hormonal (BALDISSEROTTO, 2009).

Em um estudo realizado com truta arco-íris, foi observado que a alta temperatura pode atrasar a resposta ovariana para GTH, modificando seu padrão esteroideogênico (PANKHURST; THOMAS, 1998). É também conhecido que a temperatura pode modular a conjugação de esteróides e, assim, ativar a sua livre concentração. Em espécies de águas mais quentes, como o robalo preto (*Centropristes striata*), a baixa temperatura pode atrasar esta resposta (CERDA; FERNÁNDEZ; VARGAS, 1996), e em carpa comum (*Cyprinus carpio*) o

intervalo entre administração hormonal e a desova foi negativamente correlacionada com a temperatura da água dentro do intervalo de 20 – 26 °C (DRORI et al., 1994).

3 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que devido a todos estes fatores, deve-se levar em conta as características de cada espécie, sendo possível simular de forma muito próxima as condições naturais dentro de cativeiro. Sendo possível até reproduzir espécies fora da época de piracema, desde de que se realize de forma correta as técnicas de indução hormonal, que visa aperfeiçoar os trabalhos em reprodução.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, C. S.; HAHN, N. S.; MARQUES, E. E. Patterns of food resources use by two congeneric species of piranhas (*Serrasalmus*) on the upper Parana river floodplain. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 63, n. 2, p. 177-182, 2003.
- AIZEN, J. et al. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 142, n. 2, p. 212-221, May 2005.
- AMANO, M. et al. Salmon gonadotropin: releasing hormone and gonadotropin are involved in precocious maturation induced by photoperiod manipulation in underyearling male Masu Salmon, *Oncorhynchus masou*. **General and Comparative Endocrinology**, Orlando, v. 95, n. 3, p. 368-373, Sept. 1994.
- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 166-172, abr./jun. 2003.
- ARABACI, M.; DILER, I.; SARI, M. Induction and synchronisation of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRH_a) and its effects on egg quality. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, n. 1/4, p. 475-484, 2004.
- ARAÚJO, F. G.; SIMONI, M. R. F. Relação pesocomprimento do lambari rabo vermelho (*Astyanax fasciatus paraybae*) e do lambari rabo amarelo (*Astyanax bimaculatus*) na represa de Ribeirão das Lajes, Rio de Janeiro. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 40, n. 2, p. 453-458, 1997.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixe aplicada à piscicultura**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2009. 352 p.
- BARBIERI, G.; HARTZ, S.; VERANI, J. R. O fator de condição e índice hepatossomático como indicadores do período de desova de *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819, da Represa do Lobo, São Paulo (Osteichthyes, Characidae). **Iheringia, Série Zoológica**, Porto Alegre, v. 81, n. 1, p. 97-100, 1996.

BARBIERI, G.; SANTOS, M. V. R.; SANTOS, J. M. Época de reprodução e relação peso corporal/comprimento padrão de 2 espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 1057-1065, 1982.

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. 98 p.

BROMAGE, N.; PORTER, M.; RANDALL, C. The environmental regulation of maturation in farmed fish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1, p. 63-98, Apr. 2001.

CÂMARA, J. J. C. et al. Pesca seletiva do tambuí, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Characiformes, Characidae), com a utilização de redes de emalhar, na represa de Ibitinga, rio Tietê, Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 51-60, 1991.

CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. F. Aqüicultura: um mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 393-396, out./dez. 2005.

CAROLSFELD, J. et al. Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, from an ancient teleost, herring. **Endocrinology**, Baltimore, v. 141, n. 2, p. 505-512, Feb. 2000.

CAUNT, C. J. et al. Arrestin-mediated ERK activation by gonadotropin-releasing hormone receptors: receptor-specific activation mechanisms and compartmentalization. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, n. 5, p. 2701-2710, Nov. 2006.

CERDA, H.; FERNÁNDEZ, A. L.; VARGAS, J. Estudio de la atracción del gorgojo rayado *Metamasius hemipterus* (Coleoptera: Curculionidae), olores de su planta huésped, su feromona de agregación. **Revista Caña Azúcar**, Caracas, v. 14, n. 1, p. 53-70, 1996.

CHANG, J. P. et al. Signal transduction in multifactorial neuroendocrine control of gonadotropin secretion and synthesis in teleosts-studies on the goldfish model. **General and Comparative Endocrinology**, Baltimore, v. 161, n. 1, p. 42-52, Mar. 2009.

COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS; FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte, 2000. 144 p.

COWARD, K. et al. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 12, n. 1, p. 33-58, Feb. 2002.

DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. M. Induced final maturation, ovulation, and spermiation. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**. New York: Academic, 1983. p. 351-403.

DOUGLAS, C. R. **Fisiologia aplicada à nutrição**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1046 p.

DRORI, S. et al. Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide: analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 119, n. 4, p. 393-407, Feb. 1994.

EKSTRÖM, P.; MEISSL, H. The pineal organ of fishers. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 7, n. 2, p. 199-284, June 1997.

FAIRCHILD, E. A.; HOWELL, W. H. Optimal stocking density for juvenile winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 32, n. 3, p. 300-308, 2001.

FALCÓN, J. et al. Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 18, n. 2, p. 81-88, Apr. 2007.

FELIZARDO, V. O. et al. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). **Theriogenology**, New York, v. 77, n. 8, p. 1570-1574, May 2012.

FREITAS, R. T. F.; FREATO, T. A.; SANTOS, V. B. Espécies cultivadas. In: MURGAS, L. D. S. et al. (Ed.). **Reprodução/espécies para piscicultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. p. 17-28.

GALDIOLII, E. M. et al. Diferentes fontes protéicas na alimentação de alevinos de curimba (*Prochilodus lineatus* V.). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 22, n. 2, p. 471-477, 2000.

GINNEKEN, V. J. T. van; MAES, G. E. The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 15, n. 4, p. 367-398, Nov. 2005.

GOMES, L. C. et al. Effect of density on water quality, survival and growth of larvae of the matrinxã, *Brycon cephalus* (Characidae), in ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 183, n. 3/4, p. 73-81, 2000.

GURGEL, H. C. B. Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Zoologia**, Viçosa, MG, v. 21, n. 1, p. 131-135, jan./fev. 2004.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: International Development Research Center, 1993. 144 p.

HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; SOARES, C. M. Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) na fase de crescimento. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 21, n. 3, p. 733-737, 1999.

IIGO, M. et al. Melatonin signal transduction in the goldfish, *Carassius auratus*. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 563-569, Apr. 1994.

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

KLAUSEN, C. et al. Extracellular signal-regulated kinase mediates gonadotropin subunit gene expression and LH release responses to endogenous gonadotropin-releasing hormones in goldfish. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 158, n. 1, p. 36-46, Jan. 2008.

KLUSEN, C. et al. The effect of gonadotropin: releasing hormone on growth hormone and gonadotropin subunit gene expression in the pituitary of goldfish, *Carassius auratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, New York, v. 129, n. 2/3, p. 511-516, June 2001.

LIMA, F. C. T. et al. Genera incertae sedis in characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JUNIOR, C. J. (Org.). **Checklist of freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 106-109.

LÓPEZ, H. L.; MIQUELARENA, A. M. Biogeografía de los peces continentales de la Argentina. In: LLORENTE-BOUSQUETS, J.; MORRONE, J. J. (Ed.). **México regionalización biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines**. Ciudad del México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2005. p. 509-550.

LUCAS, M. C.; BARAS, E. **Migration of freshwater fishers**. Osney Mead: Blackwell Science, 2001. 420 p.

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

MENNI, R. C.; GOMEZ, S. E.; LÓPEZ-ARMENGOL, M. F. Subtle relationships: freshwater fishes and water chemistry in southern South America. **Hydrobiologia**, The Hague, v. 328, n. 3, p. 173-197, Aug. 1996.

MIKOLAJCZYK, T. et al. Evaluation of the potency of azagly-nafarelin (GnRH analogue), administered in combination with different formulations of pimozide, on LH secretion, evulation and egg quality in common carp (*Cyprinus carpio* L) under laboratory, commercial hatchery and natural conditions. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 2, p. 447-460, May 2004.

_____. Modified absorption of sGnRH-a following rectal and oral delivery to common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 203, n. 3, p. 375-388, Jan. 2002.

MILLAR, R. P. et al. Gonadotropin-releasing hormone receptors. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 25, n. 2, p. 235-275, Apr. 2004.

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

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

MYLONAS, C. C. et al. Application of controlled-release, GnRH α -delivery systems in commercial production of white bass striped bass hybrids (*sunshine bass*), using captive broodstocks. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 140, n. 3, p. 265-280, Mar. 1996.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, Baltimore, v. 165, n. 3, p. 516-534, Mar. 2010.

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

OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. **Piscicultura: fundamentos e técnicas de manejo**. Porto Alegre: Agropecuária, 1998. 211 p.

OYAKAWA, O. T. et al. **Peixes de riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo**. São Paulo: Neotrópica, 2006. 201 p.

PANKHURST, N. W.; THOMAS, P. M. Maintenance at elevated temperature delays the steroidogenic and ovulatory responsiveness of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to luteinizing hormone releasing hormone analogue. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 166, n. 1/2, p. 163-177, June 1998.

PARK, K. W. et al. The direct vasomotor effect of thyroid hormones on rat skeletal muscle resistance arteries. **Anesthesia Analgesia**, Baltimore, v. 85, n. 4, p. 734-738, Oct. 1997.

PEREIRA, G. J. M. **Utilização de gonadotropina coriônica equína 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, 2006.

PETER, R. E.; YU, K. L. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 7, n. 2, p. 173-197, June 1997.

PILLAY, T. V. R. **Aquaculture: principles and practices**. Oxford: Fishing News Books, 1995. 575 p.

QUEIROZ, J. F. et al. **Organismos bentônicos bioindicadores da qualidade de água da bacia do médio São Francisco**. Brasília: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. 4 p. (Série Comunicado Técnico da EMBRAPA Meio Ambiente, 3).

REDDING, J. M.; PATINO, R. Reproductive physiology. In: EVANS, D. H. (Ed.). **The physiology of fishes**. London: CRC, 1993. p. 503-534.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARI JÚNIOR, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDPUCRS, 2003. 729 p.

RIBEIRO, C. da S.; MOREIRA, R. G. Fatores ambientais e reprodução dos peixes. **Revista de Biologia**, Aveiro, v. 8, n. 1, p. 58-61, jan. 2012.

SALLUM, W. B. **Reprodução artificial das principais espécies de peixes de caráter reofílico**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 56 p.

SANTOS, G. M. dos. Estudos de alimentares e hábitos alimentares de *Schizodonfasciatus* Agasiz, 1829, *Rhytiodus microlepis* Kner, 1859 e *Rhytiodus argenteofuscus* Kner, 1859, do Lago Janauacá - AM. (Osteichthyes, Characoidei, Anostomidae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 11, n. 2, p. 267-283, 1981.

SCHULZ, U. H.; MARTINS JÚNIOR, H. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 61, n. 4, p. 615-622, 2000.

SHEPHERD, J.; BROMAGE, N. **Intensive fish farming**. Oxford: BSP Professional Books, 1988. 404 p.

SHERWOOD, N. et al. Characterization of a teleost gonadotropin releasing hormone. **Proceedings Natural Academy Science**, Washington, v. 80, n. 9, p. 2794-2748, 1983.

SILVEIRA-VILELLA, F. F.; BECKER, G.; HARTZ, S. M. Diet of *Astyanax* species (Teleostei, Characidae) in an Atlantic Forest River in Southern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 45, n. 2, p. 223-232, 2002.

SILVERSTEIN, J. T. et al. Regulation and nutrient intake and energy balance in salmon. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, n. 1/4, p. 161-169, July 1999.

SOARES, R. M.; DURIGON, E. L.; BERSANO, J. G. Detection of Porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. **Journal of Virology Methods**, Amsterdam, v. 78, n. 1/2, p. 191-198, Mar. 1999.

STREIT JUNIOR, D. P. et al. Estudo comparativo da indução hormonal da espermiacção 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.

TAN-FERMIN, J. D. et al. LHRHa and pimozide-induced spawning of Asin catfi sh *Clarias macrocephalus* (Gunther) at different times during an annual reproductive cycle. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 148, n. 4, p. 323-331, Feb. 1997.

TOSINI, G. et al. The circadian clock system in the mammalian retina. **Bioessays**, Cambridge, v. 30, n. 7, p. 624-633, July 2008.

VENTURIERI, R.; BERNARDINO, G. Hormônios na reprodução artificial de peixes. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 55, p. 39-48, 1999.

VILELA, C.; HAYASHI, C. Desenvolvimento de juvenis de lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), sob diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 491-496, 2001.

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

YAMAMOTO, N. Three gonadotropin: releasing hormone neural groups with special reference to teleosts. **Anatomical Science International**, London, v. 78, n. 3, p. 139-155, Sept. 2003.

YARON, Z. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 49-73, Mar. 1995.

ZANIBONI-FILHO, E. Utilização do LHRH-a para a indução à espermiacção e desova do pacu-caranha *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 8, n. 1, p. 36-45, 1995.

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 367-373, jul./set. 2007.

ZANUY, S.; CARRILLO, M. La reproducción de los teleosteos y su aplicación en acuicultura. In: MONTEROS, J. E.; LABARTA, U. (Ed.). **Reproducción en acuicultura**. Madri: Gráfica España, 1987. p. 1-132.

ZOHAR, Y. et al. Euroendocrinology of reproduction in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 165, n. 3, p. 438-455, Feb. 2010.

_____. Gilthead sea bream (*Sparus aurata*). In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg and larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p. 94-117.

ZOHAR, Y.; MYLONAS, C. C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. In: WORKSHOP HOSTED, 1., 1999, Amsterdam. **Proceedings...** Amsterdam: Elsevier, 2001. p. 99-136.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 Protocolos de indução hormonal em lambari (*Astyanax fasciatus*) submetido à ambiente controlado

Estefânia de Souza Andrade^{1*}, Viviane de Oliveira Felizardo², Daniella Aparecida de Jesus Paula², Mônica Rodrigues Ferreira¹, Rafael Vilhena Reis Neto², Luis David Solis Murgas¹

1 – Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37200-000 Brasil.

2 - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

* Autor para correspondência: tel: (35) 91455653

E-mail: esandrade@bol.com.br

O artigo foi transcrito de acordo com as normas para submissão do periódico científico “Arquivos Brasileiro de Veterinária e Zootecnia”

1 - Resumo

Com este trabalho objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes protocolos de indução hormonal sobre os parâmetros reprodutivos de lambari (*Astyanax fasciatus*) previamente submetidos à ambiente controlado. O experimento foi realizado no laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Federal de Lavras. Nos meses de junho e julho de 2011, fêmeas de lambari (n=97) foram expostas a um fotoperíodo de 12:12 luz:escuro e temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 45 dias. No experimento realizou-se um delineamento inteiramente casualizado com 10 tratamentos, onde os tratamentos consistiam na aplicação de diferentes hormônios, sendo eles: controle negativo (sem aplicação hormonal); 6,0 mg/kg de extrato bruto de hipófise de carpa (controle positivo); 0,25; 0,5; 0,75; 0,9 mL/kg de acetato de buserelina e 40; 60; 80; 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de gonadorelina. Após 12 horas da aplicação hormonal, foi realizada coleta de sangue de todos os animais para mensuração do Hormônio Luteinizante - LH e estradiol. Em seguida os peixes foram eutanaziados e determinados o índice gonadosomático (IGS), índice hepatossomático (IHS), o número total de ovócitos produzidos por peixe, número de ovócitos em 0,1 g, o diâmetro dos ovócitos (μm) e a porcentagem de ovócitos com a posição da vesícula germinativa periférica. Os dados foram analisados por ANOVA simples, e em caso significativo as médias foram submetidas aos testes de contraste ortogonal de Dunnett entre os controles e os demais tratamentos. Foi realizada também uma análise de variância em esquema hierárquico (dose aninhada dentro de hormônio) seguido de uma análise de regressão. Os resultados não apresentaram diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos com relação ao IGS, IHS e diâmetro de ovócitos. O número total de ovócitos por fêmea e número de ovócito em 0,1 g apresentou diferença ($P<0,05$) entre os tratamentos. A regressão das doses, tendo em vista a posição periférica da vesícula germinativa apresentou a dose ideal de gonadorelina de 57 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Na análise hormonal somente LH apresentou diferença ($P<0,05$) entre o controle negativo e os tratamentos. Pode-se concluir que na reprodução induzida desta espécie, a utilização da dose de 57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gonadorelina foi a que promoveu maior migração da vesícula germinativa dos ovócitos para a posição periférica.

Palavras-chave: Acetato de buserelina. Fêmeas. Gonadorelina. Ovócitos.

2 - Abstract

This study's objective was to evaluate the effects of different hormonal inducing protocols on the reproductive parameters of lambari (*Astyanax fasciatus*) previously submitted to a controlled environment. The experiment was carried out in the Anima Physiology laboratory of Universidade Federal de Lavras. In the months of June and July of 2011, lambari females (n=97) were exposed to a photoperiod of 12:12 light/dark and temperature of $27 \pm 1^\circ\text{C}$ for 45 days. A completely randomized design was used with 10 treatments, which consisted in the application of different hormones, being: negative control (without the application of hormones); 6.0 mg/kg of crude carp pituitary extract (positive control); 0.25; 0.5; 0.75; 0.9 mL/kg of buserelin acetate and 40; 60; 80; 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of gonadorelin. Twelve hours after hormonal application, blood was collected from all animals for the measurement of Luteinizing Hormone (LH) and estradiol. Subsequently, the fish were euthanized and the gonadosomatic index (GSI), the hepatiosomatic index (HIS), the total number of oocytes produced per fish, the number of oocytes in 0.1 g, the diameter of the oocytes and the percentage of oocytes in the peripheral germinal vesicle were determined. The data were analyzed by simple ANOVA, and in the case of a significant result, the means were submitted to Dunnet's orthogonal contrast test between the controls and the other treatments. A variance analysis hierarchic scheme was also performed (dosage nested inside the hormone) followed by regression analysis. The results did not present significant difference ($P > 0.05$) between the treatments in regard to GSI, HIS and the diameter of the oocytes. The total number of oocytes per female and the number of oocytes in 0.1 g presented a significant difference ($P < 0.05$) between treatments. The regression of the dosages, considering the peripheral position of the germinal vesicle, presented the ideal dosage of gonadorelin of 57 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In the hormonal analysis, only the LH presented significant difference ($P < 0.05$) between the controls and the other treatments. It may be concluded that for induced reproduction in this species, the use of 57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of gonadorelin was that which promoted a larger migration of the germinal vesicle of the oocytes to the peripheral position.

Key-words: Buserelin acetate. Females. Gonadorelin. Oocytes.

3 Introdução

A utilização de técnicas de reprodução artificial, que consistem na indução hormonal da desova e da espermição, permite que os peixes completem seu ciclo reprodutivo no momento desejado e em condições controladas de cativeiro (Cabrita et al., 2003). O Extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) tem sido o hormônio mais utilizado na indução artificial da reprodução de espécies reofílicas na piscicultura comercial (Zaniboni filho & Weingartner, 2007).

Porém, no estado de Minas Gerais, existe uma limitação através da instrução normativa imposta pelo Ministério da Agricultura (artigo 4º e 5º), proibindo o ingresso de qualquer produto, subprodutos, despojos de animais aquáticos, vísceras, alimento vivo ou qualquer outro material presumível veiculador de agente etiológico de doenças contagiosas, restringindo assim a utilização do EBHC apenas a estudos científicos. Além disso, este extrato apresenta alto custo, dificuldade na obtenção de glândulas em quantidade e qualidade satisfatória durante todo o ano, não havendo padronização do conteúdo de gonadotropina das hipófises, uma vez que se trabalha com números ou peso das hipófises e não sua atividade hormonal (Crepaldi et al., 2006).

Uma das alternativas encontradas é a utilização de hormônios sintéticos como agonistas de GnRH e GnRH sintético (Murgas et al., 2007). Vários protocolos hormonais utilizando hormônios sintéticos ou agonistas de GnRH têm sido desenvolvidos, assim como dispositivos de liberação hormonal contínuos para mimetização da liberação destes hormônios durante o processo reprodutivo (Zohar & Mylonas, 2007).

A busarelina ([D-Ser(tBu)₆,Pro⁹-NEt]-GnRH_a), é um destes GnRH análogos já utilizado na reprodução de espécies como pacu, *Piaractus mesopotamius* (Carolsfeld et al., 1988), truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*

(Arabaci et al., 2004), curimba, *Prochilodus lineatus* e piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Paulino et al., 2011).

A gonadorelina (GnRHa) é outro hormônio sintético que tem sido utilizado na indução da reprodução de peixes (Muniz et al., 2008). Em um trabalho com este hormônio realizado com *Astyanax bimaculatus*, Felizardo et al. (2012) observaram que a gonodorrrelina foi eficiente para induzir a desova em fêmeas desta espécie.

O lambari do rabo vermelho, *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) pode ser utilizado como modelo para outras espécies, devido ao seu pequeno tamanho e facilidade de manipulação em laboratório (Lima et al., 2000). Apesar de ser um peixe de desova parcelada, sua reprodução ocorre na época das cheias sob condições ideais de fotoperíodo e temperatura, o qual realiza curtas migrações ascendentes, proporcionando o estímulo necessário para reprodução (Garutti e Britski, 2000). Diante disto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes protocolos de indução hormonal sobre os parâmetros reprodutivos de fêmeas de lambari (*Astyanax fasciatus*) previamente submetidos a ambiente controlado.

4 Material de métodos

Local e época de realização do estudo

O experimento foi realizado no laboratório de Fisiologia Animal no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA), nos meses de junho e julho de 2011. Foram utilizadas 97 fêmeas de lambari, com peso e comprimento total médio e $16,16 \pm 5,08$ g e $10,52 \pm 1,08$ cm, respectivamente, provenientes da estação de piscicultura da CEMIG/Itutinga-MG.

Período pré-experimental

Antes da alocação dos animais nos aquários foi realizada uma prévia avaliação de dez fêmeas, para verificar a condição em que se encontravam as gônadas das mesmas, visto que, no mês em que ocorreu a coleta dos animais, não está compreendido entre os meses em que ocorre a reprodução desta espécie. Para tanto, estas fêmeas foram eutanasiadas com benzoncaina a 0,2%, realizada incisão ventral e procedeu-se a retirada das gônadas para visualização macroscópica das mesmas.

Os exemplares foram mantidos em aquários de vidro de 20 litros (com uma média de 10 peixes/ aquário) em um sistema fechado de recirculação de água instalada em ambiente devidamente preparado para o controle de temperatura e fotoperíodo. Manteve-se um fotoperíodo de 12:12 horas de luz:escuro (L:E). O período de luz foi proporcionado com auxílio de lâmpadas fluorescentes controladas por um timer bivolt, modelo FX-TBA. Os peixes permaneceram em condições controladas em laboratório durante 45 dias, onde a temperatura da água foi mantida em 27 ± 1 °C e os níveis de oxigênio dissolvido e pH em $6 \pm 0,5$ mg.L⁻¹ e $6,5 \pm 0,5$, respectivamente. Durante este período, os animais receberam ração comercial com 36% de proteína bruta, na quantidade calculada de 2% do peso vivo em duas porções diárias fornecidas durante o período de luz.

Indução hormonal

Após o período de 45 dias de exposição às condições controladas no laboratório, outras dez fêmeas foram eutanasiadas para verificação das condições gonadais, aplicando metodologia igual à descrita para verificação pré-experimental. Após a verificação das gônadas, que se apresentavam repletas de ovócitos, a indução hormonal foi realizada, após jejum de 24 horas, através de

aplicação em dose única, via intramuscular (na base da nadadeira peitoral). Para esta finalidade, foram utilizados 10 tratamentos sendo:

A- controle negativo – não se aplicou nenhuma substância nos exemplares

B- 6,0 mg/kg de EBHC (EBHC-controle positivo)

C- 0,25 ml/kg de acetato de buserelina (A0.25)

D- 0,5 ml/kg de acetato de buserelina (A0.5)

E- 0,75 ml/kg de acetato de buserelina (A0.75)

F- 0,9 ml/kg de acetato de buserelina (A0.9)

G- 40 µg/kg de gonadorelina (G40)

H- 60 µg/kg de gonadorelina (G60)

I- 80 µg/kg de gonadorelina (G80)

J- 100 µg/kg de gonadorelina (G100)

O EBHC foi utilizado como controle positivo por apresentar resultados satisfatórios em trabalhos prévios realizados por outros autores para peixes do mesmo gênero, como o *Astyanax bimaculatus* (Felizardo et al., 2012; Sato et al., 2003).

Coleta de amostras

Após 12 horas, da aplicação hormonal, os exemplares foram retirados dos aquários e realizou-se a coleta de sangue pela veia caudal para mensuração de LH e estradiol. Em seguida os animais foram eutanasiados com o anestésico benzocaína 0,2% (2 g. em 5 mL álcool + 1 L de água). Após a eutanásia, procedeu-se à incisão ventral nos exemplares para retirada e pesagem das gônadas e do fígado. Calculou-se o índice gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) por meio das seguintes expressões: $IGS = (PG/PT) \times 100$, em que PG é o peso da gônada e PT é o peso total do animal; $IHS = (PF/PT) \times 100$, em que PF é o peso do fígado (Vazzoler, 1996).

Após a pesagem das gônadas foram coletados, da porção mediana das gônadas, 0,1 g de ovócitos das gônadas para determinação do número de ovócitos. A medida de diâmetro (DIAM μm) foi realizada em 10 ovócitos de cada fêmea, previamente imersos em solução de Gilson (5 mL de álcool 60%, 44 de água destilada, 0,7 ácido nítrico 80%, 1 g de cloreto de mercúrio e 0,9 mL de ácido acético glacial). Para a análise da posição da vesícula germinativa periférica, 25 ovócitos de cada fêmea foram imersos em solução de Serra (60 mL de álcool 90%, 30 mL de formaldeído e 10 mL de ácido acético glacial) sendo avaliados com auxílio de microscópio óptico (Murgas et al., 2003).

Análises estatísticas

Para a avaliação dos dados obtidos no experimento foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com 10 tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância simples, utilizando-se o pacote computacional SAEG, e em caso significativo as médias foram submetidas aos testes de contraste ortogonal de Dunnet entre os controles e os demais tratamentos. Foi realizada também uma análise de variância em esquema hierárquico (dose aninhada dentro de hormônio) seguido de uma análise de regressão.

5 Resultados

Na avaliação gonadal prévia realizada antes de expor os animais às condições controladas do laboratório, foi observado que as fêmeas não estavam em período reprodutivo, visto que, a cavidade celomática das fêmeas não estava abaulada, nem o orifício urogenital edemaciado e avermelhado. Além disso, as gônadas estavam pequenas, com poucos ovócitos e de pequeno tamanho. Porém, após os 45 dias de manutenção sob estas condições, as fêmeas já se mostravam

preparadas para reproduzir, com as gônadas já repletas de ovócitos, aparentemente ocupando grande parte da cavidade celomática.

Dentre os parâmetros reprodutivos avaliados, o IGS, o IHS e o diâmetro não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) entre os diferentes tratamentos empregados e o grupo controle, tanto positivo como o negativo (Tab. 1). No entanto, quando se avaliou o número de ovócito em 0,1 g, os tratamentos A0,75; A0,9; G40 e G60 diferiram ($P<0,05$) do grupo controle positivo, apresentando valores maiores. Por outro lado, somente o tratamento G40 se apresentou diferente ($P<0,05$) do controle negativo para esta variável (Tab. 1).

TABELA 1. Tratamentos, valores médios (\pm desvio padrão) do índice gonadossomático (%), índice hepatossomático (%), diâmetro de ovócitos (μm), posição de vesícula não observada(%) e posição da vesícula germinativa central (%) e o número de ovócitos em 0,1 g de ovócitos de desova de lambari (*Astyanax fasciatus*) analisados (n=77).

Tratamentos (n)	IGS ⁽¹⁾	IHS ⁽²⁾	Diâmetro	0,1 g de ovócito*	Posição da vesícula germinativa não observada*	Posição da vesícula germinativa central
Controle (7)	3,6 \pm 4,0	1,0 \pm 0,8	944,1 \pm 120,3	282,7 \pm 108,8 aA	56,43 \pm 23,0 bA	42,86 \pm 22,9
EBHC (10)	7,2 \pm 3,0	0,9 \pm 0,5	1004,0 \pm 360,5	183,2 \pm 81,2 aA	22,50 \pm 22,1 aA	39,44 \pm 19,0
A0,25 (10)	8,8 \pm 3,6	0,5 \pm 0,2	812,1 \pm 68,0	296,8 \pm 92,9 aA	40,00 \pm 25,5 aA	50,91 \pm 19,6
A0,5 (8)	6,9 \pm 2,2	0,7 \pm 0,7	876,3 \pm 84,3	231,8 \pm 97,0 aA	35,63 \pm 21,8 aA	58,75 \pm 18,5
A0,75 (7)	6,0 \pm 2,8	0,8 \pm 0,5	896,6 \pm 84,6	344,5 \pm 119,6 bA	46,43 \pm 21,7 aA	51,43 \pm 20,6
A0,9 (8)	7,4 \pm 4,3	1,1 \pm 0,7	896,0 \pm 84,1	422,3 \pm 168,9 bA	30,00 \pm 21,0 aA	62,50 \pm 22,8
G40 (9)	7,5 \pm 2,8	0,4 \pm 0,1	848,8 \pm 100,0	518,2 \pm 118,4 bB	14,44 \pm 15,7 aB	58,89 \pm 21,6
G60 (6)	5,9 \pm 2,7	0,6 \pm 0,2	848,2 \pm 100,4	367,8 \pm 142,9 bA	20,00 \pm 16,4 aA	52,50 \pm 14,4
G80 (4)	8,1 \pm 2,5	0,5 \pm 0,1	852,2 \pm 112,7	299,7 \pm 49,6 aA	38,75 \pm 23,2 aA	43,75 \pm 24,3
G100 (8)	5,9 \pm 3,1	1,0 \pm 1,1	876,4 \pm 120,1	211,1 \pm 71,7 aA	33,75 \pm 21,2 aA	51,88 \pm 24,0

⁽¹⁾ IGS: índice gonadossomático

⁽²⁾ IHS: índice hepatossomático

EBHC: 6,0 mg/kg de Extrato Bruto de Hipófise de Carpa; A0.25: 0,25mL/kg de acetato de buserelina; A0.5: 0,5 mL/kg de acetato de buserelina; A0.75: 0,75 mL/kg de acetato de buserelina; A0.9: 0,9 mL/kg de acetato de buserelina; G40: 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de gonadorelina; G60: 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de gonadorelina; G80: 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de gonadorelina; G100: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de gonadorelina

* Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem estatisticamente do controle positivo em relação aos demais tratamentos pelo teste de Dunnett a 5%.

* Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem estatisticamente do controle negativo em relação aos demais tratamentos pelo teste de Dunnett a 5%.

n= número de animais

Avaliando-se a posição periférica da vesícula germinativa foi possível observar que os tratamentos utilizando a gonadorelina mostrou-se mais eficiente ($P < 0,05$) em relação aos tratamentos que utilizaram acetato de buserelina e ao grupo controle negativo. No entanto, quando comparado ao grupo controle positivo, as maiores ($P > 0,05$) porcentagens foram obtidas com os tratamentos G40 e G60 (Tab. 2).

No teste de regressão com as doses de gonadorelina utilizadas, foi possível determinar a dose ideal de 57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de gonadorelina para indução de lambari (Fig. 1).

TABELA 2. Valores médios (\pm desvio padrão) da posição de vesícula germinativa periférica (%) de lambari (*Astyanax fasciatus*) analisados ($n=77$).

Tratamentos (n)	Controle - *	EBHC (controle+) *
Controle (7)	0,7 \pm 1,8 b	0,7 \pm 1,8 b
EBHC (10)	36,5 \pm 12,0 a	36,5 \pm 12,0 a
A0,25 (10)	9,5 \pm 9,8 b	9,5 \pm 9,8 b
A0,5 (8)	5,8 \pm 6,6 b	5,8 \pm 6,6 b
A0,75 (7)	2,1 \pm 5,6 b	2,1 \pm 5,6 b
A0,9 (8)	7,5 \pm 12,2 b	7,5 \pm 12,2 b
G40 (9)	26,6 \pm 13,6 a	26,6 \pm 13,6 a
G60 (6)	27,5 \pm 9,3 a	27,5 \pm 9,3 a
G80 (4)	17,5 \pm 2,8 a	17,5 \pm 2,8 b
G100 (8)	14,3 \pm 8,6 a	14,3 \pm 8,6 b

EBHC: 6,0 mg/kg de Extrato Bruto de Hipófise de Carpa; A0.25: 0,25 mL/kg de acetato de buserelina; A0.5: 0,5 mL/kg de acetato de buserelina; A0.75: 0,75 mL/kg de acetato de buserelina; A0.9: 0,9 mL/kg de acetato de buserelina; G40: 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de gonadorelina; G60: 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de gonadorelina; G80: 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de gonadorelina; G100: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de gonadorelina.

Controle -: controle negativo

Controle +: controle positivo

n= número de animais

* Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5%.

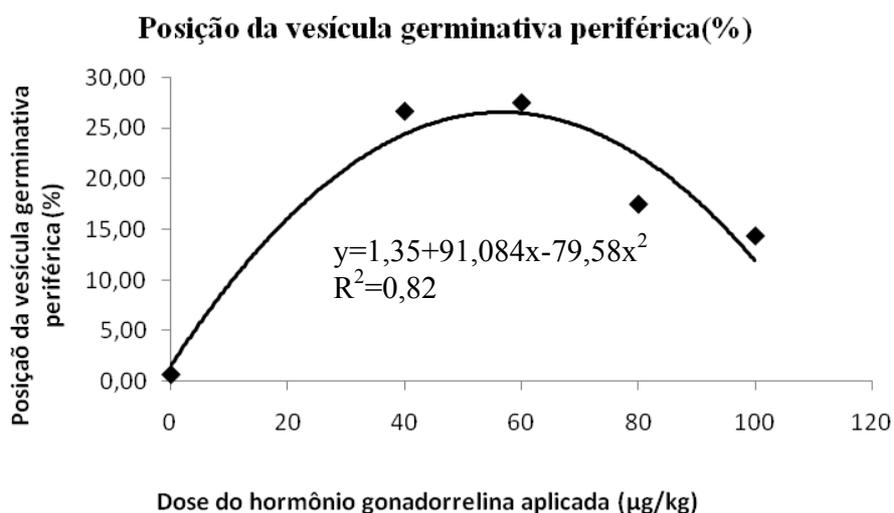


FIGURA 1- Regressão entre a posição da vesícula germinativa periférica e a dose aplicada do hormônio gonadorelina

No presente estudo, as fêmeas de lambari induzidas com diferentes protocolos hormonais não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) nos níveis plasmáticos de estradiol, já para os níveis de hormônio luteinizante-LH foi identificado diferença significativa ($P<0,05$), quando comparados ao controle negativo, o qual não recebeu nenhum hormônio, sendo este maior que os demais tratamentos (Tab. 3).

TABELA 3. Valores médios (\pm desvio padrão) dos níveis plasmáticos de Hormônio-Luteinizante- LH (mIU/mL) e estradiol (pg/mL) de lambari (*Astyanax fasciatus*) analisados (n=77).

Tratamentos (n)	Hormônio Luteinizante*	Estradiol
Controle (7)	1,8 \pm 0,07 A	5679,1 \pm 1559,7
EBHC (10)	0,7 \pm 0,15 B	7825,0 \pm 1559,7
A0,25 (10)	0,9 \pm 0,23 B	7127,2 \pm 2122,6
A0,5 (8)	1,1 \pm 0,13 B	6603,1 \pm 2123,0
A0,75 (7)	0,7 \pm 0,37 B	5618,7 \pm 1957,0
A0,9 (8)	1,1 \pm 0,08 B	5413,7 \pm 588,7
G40 (9)	1,1 \pm 0,11 B	9055,6 \pm 2247,0
G60 (6)	0,9 \pm 0,11 B	6311,5 \pm 881,5
G80 (4)	0,8 \pm 0,17 B	3957,3 \pm 928,7
G100 (8)	1,0 \pm 0,13 B	9321,9 \pm 2511,0

EBHC: 6,0 mg/kg de Extrato Bruto de Hipófise de Carpa; A0.25: 0,25mL/kg de acetato de buserelina; A0.5: 0,5 mL/kg de acetato de buserelina; A0.75: 0,75 mL/kg de acetato de buserelina; A0.9: 0,9 mL/kg de acetato de buserelina; G40: 40 μ g/kg de gonadorelina; G60: 60 μ g/kg de gonadorelina; G80: 80 μ g/kg de gonadorelina; G100: 100 μ g/kg de gonadorelina

* Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem estatisticamente pela análise do contraste.
n= número de animais

6 Discussão

Mediante a observação das fêmeas pré e pós-acondicionamento em condições controladas de laboratório é possível sugerir que mesmo não estando em seu período reprodutivo, as condições controladas podem induzir esta espécie a alterar seu ciclo levando-as a uma preparação à reprodução fora da época em que geralmente ocorre em ambiente natural. O lambari apesar de ser um peixe de desova parcelada, apresenta seu pico reprodutivo entre as estações

de primavera e verão, influenciado principalmente pelas condições ambientais em que se encontra (Garutti e Britski, 2000).

Provavelmente o controle, principalmente, da temperatura e do fotoperíodo em laboratório tenha proporcionado estímulo adequado para que esta espécie tenha se preparado para reproduzir, este resultado é muito importante, pois desta forma em períodos considerados de intersafra reprodutiva, pode-se manipular o ambiente e induzir a reprodução de algumas espécies de peixes. De acordo com Bromage et al. (2001), a reprodução de peixes teleósteos é controlada pelo aumento ou a diminuição do fotoperíodo e temperatura, a fim de atingir máxima sobrevivência da prole, devido às condições favoráveis que são alcançadas em determinada época do ano.

Os parâmetros IGS, IHS e diâmetro dos ovócitos não foram alterados mediante a aplicação hormonal, visto que nenhum tratamento que se realizou a indução hormonal diferiu do grupo controle negativo. Este resultado era esperado, tendo em vista que a maioria dos peixes mantidos em cativeiro são capazes de atingir o crescimento dos folículos até a fase de vitelogênese sem que haja a indução hormonal, mas não consegue atingir a fase de maturação ovocitária e desova (Podhorec e Kouril, 2009), portanto, a indução hormonal provavelmente não altera o IHS porque toda a função do fígado já foi efetuada antes da indução.

Também o IGS e o diâmetro dos ovócitos não apresentaram alteração em relação a fase pré e pós indução hormonal, pois para se realizar a indução hormonal é necessário que a vitelogênese já tenha se completado, ou seja, o ovócito já está preparado (Zaniboni Filho e Weingartner, 2007). Sabe-se que a vesícula germinativa (núcleo), no início da maturação, ocupa posição central sendo que a etapa final da maturação consiste basicamente na migração e posterior desintegração da vesícula germinal, com o rompimento do envelope

folicular e a conseqüente liberaçãõ dos ovócitos na luz do ovário, estando à induçãõ hormonal diretamente relacionada a este estágio (Godinho et al., 2000).

O valor médio do IGS encontrado foi de $6,91\% \pm 3,5$. De acordo com estudos realizados por Barbieri et al. (1996) com *Astyanax bimaculatus* onde foram realizadas coletas mensais durante um ano na represa do Lobo, que localiza-se na regiãõ central do estado de São Paulo, foi observado um valor máximo do IGS de 10% no período de outubro-novembro, época considerada ideal para a reproduçãõ das espécies de peixes em geral, representando valores próximos ao encontrado neste trabalho.

Os valores médios de diâmetro dos ovócitos encontrados foram muito próximos aos encontrados em alguns estudos como o realizado por Felizardo et al. (2012), com *Astyanax fasciatus* utilizando gonadorelina ($1030,95\mu\text{m}$), Dalai-Corte e Azevedo (2010), com *Astyanax henseli* ($889\ \mu\text{m}$) sem utilizaçãõ hormonal e Romagosa et al.(2001) com *Brycon cephalus* utilizando EBHC ($1001,6\ \mu\text{m}$).

A porcentagem observada de ovócitos com a vesícula germinativa na posiçãõ periférica não diferiu entre os tratamentos G40 e G60 em relaçãõ ao grupo controle positivo. O EBHC foi utilizado como controle positivo, por já ter sido testado em outras espécies como o *Astyanax bimaculatus* (Felizardo et al., 2012; Sato et al., 2003) e ter sido indicado como um hormônio eficiente na reproduçãõ induzida dessa espécie. Porém, neste trabalho o EBHC assim como os demais tratamentos, também apresentou uma porcentagem baixa de ovócitos com a vesícula germinativa na posiçãõ periférica indicando que houve influênciã de outros fatores além dos hormônios. Segundo Yaron (1995), a avaliaçãõ da posiçãõ da vesícula germinativa nos ovócitos é um parâmetro muito importante para a análise da viabilidade dos ovócitos, pois ovócitos que não apresentam migraçãõ da vesícula para a periferia não são fecundáveis.

Quando se avaliou a posição periférica da vesícula germinativa, a dose ideal indicada para a utilização do hormônio gonadorelina (57 µg / kg de peixe) é aproximadamente 30% inferior a dose recomendada por Felizardo et al. (2012) para indução de *Astyanax bimaculatus* (80 µg / kg de peixe), porém não pode-se afirmar com este trabalho que dose citada faria os peixes desovarem. Tendo em vista que o produtor visa aumentar sua lucratividade, a determinação da dose ideal pode ser uma alternativa para diminuição de custos sem alteração da produtividade na reprodução de peixes.

Neste trabalho o fato de não ter sido observado diferença dos níveis de estradiol nos diferentes tratamentos, inclusive no grupo controle negativo, que não recebeu a aplicação hormonal, pode ser justificada pelo fato que todos os peixes estavam preparados para receber a indução, ou seja, estavam com ovócitos vitelogênicos. Segundo Jalabert (2005), a vitelogênese é regulada diretamente pela produção de FSH que atua induzindo a produção de estradiol no ovário, que é responsável pela produção de vitelogenina no fígado, fato este que precede o processo de indução.

Mehdi e Ehsan (2011) descrevem que as altas concentrações de estradiol estimulam a síntese da vitelogenina, que é incorporado pelos ovócitos, sob a ação do FSH. A função respectiva de cada gonadotropina no controle da reprodução em peixes foi estudada principalmente em salmonídeos. Assim, o FSH estaria associado, principalmente, com o início da maturação e com 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 e Negrão, 2003).

A diferença observada nos níveis de LH do grupo controle negativo em relação aos tratamentos onde foi realizada a indução hormonal, possivelmente é devida liberação do hormônio antes da coleta do sangue, visto que a migração da

vesícula ocorreu antes da coleta do sangue, podendo indicar a ocorrência da ovulação.

Nas fêmeas o LH parece estimular a produção da substância indutora da maturação de ovócitos, a 17α 20 β -P, nas células dos folículos ovarianos (Baldisserotto, 2002). Alguns autores tem reportado, em peixes não salmonídeos, uma correlação entre o aumento da transcrição de RNAm do β -LH e os valores de IGS associado aos estágios finais de maturação ovocitária (Kajimura et al., 2004).

Steven et al. (2000), estudou sobre a síntese e liberação de LH armazenado na hipófise durante a vitelogênese. Neste trabalho os níveis de LH e seu mRNA na hipófise não diferiu entre fêmeas selvagens e de cativeiro, demonstrando que os peixes em cativeiro não se reproduzem naturalmente por uma falha na liberação do LH e não na síntese deste hormônio, uma vez que o mRNA do receptor da hipófise para o GnRH, mais importante para a síntese de LH, foi semelhante entre fêmeas selvagens e de cativeiro. Isto sugere que a interrupção da liberação de LH das hipófises de peixes em cativeiro não é devido a uma disfunção da responsividade da hipófise, mas pode estar relacionado com o controle de função reprodutiva pelo cérebro (Mylonas et al., 2010).

Segundo Breton et al., (1998), tem sido observado em algumas espécies de peixes que os níveis plasmáticos de ambas as gonadotrofinas FSH e LH aumentam progressivamente, a partir de cerca de 6 e 4 dias respectivamente, antes do início da maturação. Sendo que logo após a ovulação é possível observar um grande aumento dos níveis de FSH e uma diminuição do LH durante até duas semanas, justificando assim os resultados encontrados neste trabalho.

7 Conclusão

Na reprodução induzida desta espécie, recomenda-se a utilização do hormônio gonadorelina na dose de 57 µg/mL, que pode ser um indutor alternativo à utilização do EBHC, por ter promovido a maior migração da vesícula germinativa dos ovócitos para a posição periférica.

8 Referências bibliográficas

- ARABACI, M.; DILER, I.; SARI, M. Induction and synchronisation of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRHa) and its effects on egg quality. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, v.1-4, p. 475-484, 2004
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 212p., 2002.
- BARBIERI, G.; HARTZ, S. M.; VERANI, J. R. The condition factor and hepatosomatic index as an indicators of the spawning of *Astyanax Fasciatus* at Lobo Reservoir, Sao Paulo. **Iheringia Serie Zoologia**, v. 81, p.97-100, 1996.
- BRETON, B.; GOVOROUN, M.; MIKOLAJCZYK, T. GTH I and GTH II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary responsiveness to GnRH-A stimulation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 111, p. 38–50, 1998
- BROMAGE, N.; PORTER, M.; RANDALL, C. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. **Aquaculture**, 197:63-98, 2001.
- CABRITA, E.; CHEREGUINI, O.; LUNA, M.; DE PAZ, P.; HERRÁEZ, M. P. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**, v. 221, p.593–604, 2003.

CAROSFELD, J.; RAMOS, S.M.; ORMANEZI, R.; GOMES, J.H.; BARBOSA, J.M.; HARVEY, B. Analysis of protocols for application of LHRH analog for induced final maturation and ovulation of female pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887). **Aquaculture**, v.74, p.41-8, 1988.

CREPALDI, D. V.; FARIA, P.M.C.; TEIXEIRA, E.A. ; RIBEIRO, L. P.; COSTA, Â. A. P.; MELO, D.C.; CINTRA, A. P. R.; PRADO, S. A.; COSTA, F. A. A.; DRUMOND, M. L.; LOPES, V. E.; MORAES, V. E. Utilização de hormônios na reprodução induzida do surubim (*Pseudoplatystoma* spp). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.30, n.3/4, p.168-173, jul./dez. 2006.

DALA-CORTE, R. B.; AZEVEDO, M. A. Biologia reprodutiva de *Astyanax henseli* (Teleostei, Characidae) do curso superior do rio dos Sinos, RS, Brasil. **Iheringia Série Zoológica**, Porto Alegre, v. 100, n.3, p.259-266, 2010

FELIZARDO, V.O.; MURGAS, L.D.S.; ANDRADE, E.S.; LÓPEZ, P.A.; FREITAS, R.T.F.; FERREIRA, M. R. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). **Theriogenology**, v.77, p. 1570–1574, 2012

GARUTTI, V., BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da Bacia do Alto Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS. Serie Zoológica**, Porto Alegre, v.13, p.65-88, 2000.

GODINHO, H. M.; SERRALHEIRO, P. C. da S.; FERRAZ, E. de M.; PIMENTEL, C. M. M.; OLIVEIRA, I. da R.; PAIVA, P. de. Reprodução induzida em robalo *Centropomus parallelus* Poey, 1860. Induced spawning of snook *Centropomus parallelus* Poey, 1860. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo. v.37, n.1, 2000

ISEKI, K.K.; NEGRÃO, J.A. Controle neuroendócrino da reprodução de peixes teleósteos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.1, p.11-22, 2003.

JALABERT, B. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. **Reproduction Nutrition Development**, v.45, p. 261–279, 2005.

KAJIMURA, M.; CROKE, S.J.; GLOVER, C.N.; WOOD, C.M. Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: The effect of feeding and fasting on the excretion of ammonia, urea and other nitrogenous waste products in rainbow trout. **Journal of Experimental Biology** 207, 1993-2002, 2004.

MEHDI, Y.; MOUSAVI, S. E. A review of the control of reproduction and hormonal manipulations in finfish species. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n.7, p. 1643-1650, 2011

MUNIZ, J.A.S.M.; CATANHO, M.T.J.A.; SANTOS, A.J.G. Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). **Boletim do Instituto de Pesca. São Paulo**, v.34, p.205-211, 2008.

MURGAS, L.D.S., FRANCISCATO, R.T., SANTOS, A.G.O., 2003. Avaliação espermiática pós descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Rev. Bras. Zootec.** 32, 1810-1814.

MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B.; FREITAS, R.T.F.; PEREIRA, G.J.M. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007.

MYLONAS, C.C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, v.165,p. 516-534, 2010.

PAULINO, M. S.; MILIORINI, A. B.; MURGAS, L.D.S.; LIMA, F. S.M.; FELIZARDO, V. O. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de buserelina. **Revista Científica de Pesca, Aqüicultura e Limnologia**, v. 37, n.1, p.39-45 2011.

PODHOREC, P.; KOURIL, J. Induction of final oocyte maturation in cyprinidae fish by hypothalamic factors: A review. **Veterinary Medicine**,v.54, n.3, p.97-110, 2009.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M.Y.; BORELLA, M. I.; FENERICH-VERANI, N. Seleção e caracterização de fêmeas de matrinxã, *Brycon cephalus*, induzidas a reprodução. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, p. 113-121, 2001.

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.

STEVEN, C., GOTHILF, Y., HOLLAND, M.C.H., STUBBLEFIELD, J., MYLONAS, C.C., ZOHAR, Y., 2000. **Differential expression of the three GnRH genes in wild and captive striped bass, *Morone saxatilis*, in response to natural and hormonally induced maturation**. In: NORBERG, B., KJESBU, O.S., TARANGER, G.L., ANDERSSON, E., STEFANSSON, S.O. (Eds.), *Reproductive Physiology of Fish*. University of Bergen, Bergen, p. 66.

VAZZOLER, A. E. de M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM/Nupélia, 1996. 169 p.

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

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2007.

ZOHAR, Y.; MYLONAS, C. C. Endocrine manipulations of spawning in culture fish: from hormones to genes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, p. 99-136, 2007

**ARTIGO 2 Effect of different hormonal inducers and time of application
about the reproduction of Curimba**

Estefânia de Souza Andrade^{a*}, Viviane de Oliveira Felizardo^b, Daniella
Aparecida de Jesus Paula^b, Aline Ferreira Souza de Carvalho^a, Victor Ferreira
Ribeiro Mansur^a, Luis David Solis Murgas^a

^aDepartment of Veterinary Medicine of Universidade Federal de Lavras, Lavras,
Minas Gerais, Brazil.

^bDepartment of Animal Science of Universidade Federal de Lavras, Lavras,
Minas Gerais, Brazil. *Corresponding author: esandrade@bol.com.br Tel.: 55
35 9145 5653

O artigo preparado de acordo com a norma para submissão do periódico Journal
of Animal Science

ABSTRACT

The objective of the study was evaluating the influence of hormonal induction periods in curimba (*Prochilodus lineatus*) using gonadorelin or crude carp pituitary extract (CCPE). The experiment was conducted in the aquiculture sector in Universidade Federal de Lavras (UFLA), done in a completely randomized 2x2 factorial (two hormones and two application periods), using 16 curimba pares. The animals were induced with CCPE and gonadorelin in which, for CCPE (0.4 and 4 mg/kg) and gonadorelin (50 and 70 µg/kg) with an approximate interval of 12 hours between applications which occurred at 12:00 (half light – HL) or 24:00 (half dark – HD). The time of ovulation was calculated in degree hours. In the females' case, weight at spawning (g), number of oocytes/g, diameter (µm) and the position of the oocyte's germinal vesicle (% GVPP) were registered. In the males' case, total volume of semen, spermatoc concentration (number of spermatozoa/mL), motility rate (%) and duration (s) and spermatoc morphology were calculated. Fertility and hatching rates were evaluated. The data were submitted to variance analysis using SAEG, according to a statistical model with two main effects (hormones and application period), and the interaction between

these factors. When significant ($P < 0.05$) for each of the factors or the interaction, the means were compared by the F test (5%). There was no interaction ($P > 0.05$) of the hormone and the application period used in the spawning variable. However, an effect of the hormone occurred ($P < 0.05$) regarding the variables: spawning weight, oocytes/g and hours degree of spawning. The best results for spawning weight and number of oocytes/g were observed in females which received CCPE, and also presented the lowest hours degree. There was no interaction ($P > 0.05$) of hormone application period in the variables analyzed in the semen. However, the use of CCPE showed a larger seminal volume than the use of gonadorelin, independent of the application period. When the hormonal application was done in HD, the CCPE showed motility duration superior in relation to using gonadorelin. The animals which received hormonal induction with CCPE, independently from the application period, showed fertilization and hatching rates, while gonadorelin did not provide fertilization or hatching. In conclusion, gonadorelin, in the used dosage, was not efficient in obtaining viable curimba larvae, independently of the application period. In addition, CCPE may be applied in males and females at any application period without altering gamete quality.

Key-words: Crude carp pituitary extract. Gametes. Gonadorelin. Photoperiod. Female. Reproductive rates.

1. INTRODUCTION

The curimba, *Prochilodus lineatus*, is a migratory species of fish, native of South America (Viveiros and Godinho, 2008). This species has an important role in the ecosystem, as well as in commercial and subsistence fishing in southeastern Brazil, with high productivity when bred in captivity (Maduenho and Martinez, 2008).

The reproduction of this species occurs during the rainy season and the spawning is regulated by endogenous rhythms mediated by external factors, such as changes in temperature, cyclical changes in light among other variable which determine the ideal period for the survival of the offspring (Woynarovich, 1989; Zanuy and Carrillo, 1987). In addition, the curimba, such as other migratory species, do not reproduce in captivity, demanding hormone application for reproduction (Murgas et al., 2003).

Crude Carp Pituitary Extract (CCPE) is extensively used to induce final maturation in Brazilian migratory fish, reaching acceptable results

for many species, including *Prochilodus lineatus* (Felizardo et al., 2010) and *Brycon orbignyanus* (Carolsfeld et al., 2003). However, its high cost incentives research on alternative hormones, such as ovaprim, hCG (human chorionic gonadotropin), GnRH (gonadotropin-releasing hormone) and GnRH analogs (Donaldson and Hunter, 1983).

Muniz et al. (2008) and Felizardo et al. (2012) investigated the influence of the application period of the hormones CCPE and gonadorelin in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and *Astyanax bimaculatus*, respectively, evaluating their reproductive characteristics.

However, there are few reports in literature on the influence of hormone application period to induce reproduction in curimba. Therefore, the objectives of this study were to determine the reproductive parameters of male and female curimba (*P. lineatus*) induced with gonadorelin and CCPE in different application times.

2. MATERIAL AND METHODS

The experiment was conducted in March of 2010, in UFLA's fish culture station and in the Physiology and Pharmacology laboratory of the Veterinary Medicine Department. Sixteen pares of curimba broodstock

with an average of 398 ± 48 g of weight and 26.4 ± 1.74 cm of length, provided selected cultivating tanks in the fish culture station.

The experiment was done in a completely randomized design, in a 2x2 factorial scheme (two hormones and two applications), with four replicates, and each pair considered an experimental unit.

The selection of the animals which would receive hormonal induction was done according to the reproductive characteristics; in females, hyperemia and the edematous aspect of the urogenital papilla, and in males, semen elimination in response to manual massage in the coelomatic cavity (Felizardo et al., 2010a).

The animals were marked and transferred to net tanks (2 m length and width), at a density of 4 animals per tank and a natural photoperiod, in which the light period began at 06:00 and ended at 18:30 hours. The fish were maintained in fasting for 24 hours before hormonal application.

The animals received two CCPE injections (1st of 0.4 mg/kg and 2nd of 4 mg/kg), and gonadorelin (1st of 50 µm/kg and 2nd of 70 µg/kg), with an interval of approximately 12 hours between applications. The hormonal applications occurred at different periods (Table 1); the first group received the first application of different hormones

(4 pares/hormone) at 12:00 hours, which is considered the half light period (HL) and the second group received the first application at 00:00 hours, considered the half dark period (HD) (Table 1).

For the collection of the gametes, the fish were captured, had their urogenital papilla cleaned and dried with paper towel to avoid the activation of the semen or hydration of the oocyte, through contact with the animal's feces or urine water. Sequentially, a manual compression of the coelomatic cavity was done in the cranial-caudal direction. The semen was collected in sterile and graduated test tubes and the oocytes were collected in beakers.

2.1 Evaluation of the oocytes

Immediately after collected, the oocytes were weighed and 0.1 g of oocytes were sampled to determine quantity of oocytes/g. The diameter (mm) was measured of 10 oocytes, previously immersed in Gilson solution (5 mL of 60% alcohol, 44 mL of distilled water, 0.7 mL of 80% nitric acid, 1 g of mercury chloride and 0.9 mL of glacial acidic acid), collected of each female.

To analyze the oocytes' germinal vesicle peripheral position (%GVPP), 25 oocytes were analyzed of each female, after being immersed in Serra solution (60 mL of 90% alcohol, 30 mL of formaldehyde and 10 mL of glacial acetic acid). The diameter was measured and the GVPP analyzed with an optical microscope in 40x magnification (Murgas et al., 2003).

2.2 Evaluation of the semen

The evaluated characteristics in the semen were: total volume (mL), spermatic concentration (number of spermatozoa/mL), motility rate (%) and duration (s) and spermatic morphology.

For spermatic concentration, the fresh semen was diluted in formaldehyde solution in the proportion of 10:990 μL (semen:solution). The evaluation was done in a Neubauer chamber under an optical microscope. The obtained value was multiplied by the correction factor 50.000, obtained as the concentration of cells per mm^3 . The conversion to spermatozoa/mL was done by multiplying the reported values by 10^3 (Felizardo et al., 2010 b).

Motility rate and duration were observed in an aliquot of 10 μ L of semen in a histological lamina, previously activated with distilled water in a proportion of 1:4 (semen:water), and analyzed under a microscope magnified 400x. Motility duration was observed from the moment of activation until only 10% of the spermatozoa were active (Felizardo et al., 2010; Murgas et al., 2007).

For the analysis of spermatic morphology, an aliquot of semen diluted in formalin solution was used. The semen was deposited on a histological lamina and stained with Rose Bengal. The laminas were observed in optical microscope (1000x). One hundred spermatic cells were analyzed from each sample, and the percentage of normal and abnormal spermatozoa calculated, considering head (isolated, macrocephaly and microcephaly), central part and tail (fractured/broken, curled and isolated).

2.3 Fertilization

For fertilization, an aliquot of 10 μ L of semen was added to 0.1 g of oocyte (Felizardo et al., 2010 b), procedure done separately for each pair). After combining the semen and oocytes, the gametes were

activated with 100 mL of water taken from the tank in which the broodstock were placed, at a temperature of 27° C.

After fertilization, the eggs were distributed in PVC experimental incubators, with capacity for one liter, located inside a 1000 L tank, with water at $28 \pm 1^\circ$ C. The incubators were equipped with constant aeration, which provided movement of the eggs and adequate environment for fertilization (Felizardo et al., 2010 a).

The fertilization rates were evaluated eight hours after the activation of the gametes, in stereoscopic binocular microscope, using the formula employed by Miliorini et al. (2011):

$FR = [E / (E+UE)] \times 100$, in which:

FR: fertilization rate;

E: number of viable embryos;

UE: number of unviable embryos.

The hatching rate was calculated 16 hours after fertilization. All the larvae were counted using a stereoscopic binocular microscope. The hatching rate was estimated using the formula:

$HR = L / FR \times 100$, in which

HR: hatching rate;

L: number of larvae;

FR: Fertilization rate.

The data were submitted to ANOVA, using the computer package SAEG, following the statistical model with two main effects (hormone and application period), and the interaction between these factors. When a significant difference occurred ($P < 0.05$) between the main effect or its interaction, the means were compared by the F test (5% probability).

3. RESULTS

Of the eight females induced with Crude Carp Pituitary Extract, seven went through spawning. However, when induction with gonadorelin was used, only four responded positively to the treatment (Table 2).

There was no significant difference ($P > 0.05$) between the interaction of the hormone and the application period regarding the variables oocyte diameter and germinal vesicle peripheral position of the oocyte (Table 2). However, the effect of the hormone was significant ($P < 0.05$) regarding the variables: weight at spawning (g), oocyte/gram and

hours degree (Table 2). The application period was not significant for any of the variables.

The best result of weight of spawning (g) and oocytes/g was observed in females which received CCPE with values of 49.2 ± 31.6 and 141.5 ± 1865 g, respectively. The CCPE also presented the least spawning hours degree.(Table 2)

All the males responded to hormonal induction, releasing semen independently of the used hormone, application period and interaction. There was no interaction ($P > 0.05$) between the hormone and the application period regarding the variables semen volume, motility, concentration and spermatic abnormality. However, when only analyzing the hormone, a significant difference ($P < 0.05$) occurred for semen volume, in which the use of CCPE presented a larger volume in relation to the use of gonadorelin, 1.15 ± 0.3 and 0.5 ± 0.2 , respectively, independent of the application period. When the application period was done in HD, the CCPE presented larger ($P < 0.05$) spermatic motility duration (112.2 ± 48.2) in comparison to the use of gonadorelin, in the same application period (Table 3).

The animals which received hormonal induction with CCPE, independent of the application period, obtained fertilization and hatching rate, on the other hand, gonadorelin did not supply fertilization or hatching rates, independent of application period (Figure 1).

4. DISCUSSION

In spite of 50% of the females induced with gonadorelin positively responding to hormonal induction, the hormone was not efficient at providing fertilization and hatching rates, independently of the application period.

Gonadorelin was recently tested and recommended to induce the reproduction of *Astyanax bimaculatus* with a single dose of 80 µg/kg of fish (Felizardo et al., 2012). The com uma única dose de 80 µg / kg de peixe (Felizardo et al., 2012). The divergence in the results for these two species may be due to the fact of *A. bimaculatus* being a sedentary species and, therefore, is not completely dependent of environmental factors to reproduce.

A larger value of hours degree was observed in the animals induced with gonadorelin when compared to those induced with CCPE. This

might be due to the fact of the application of CCPE be a direct source of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), these hormones act directly at the gonads, inducing ovulation. On the other hand, gonadorelin is an analog of the hormone GnRH, acting directly at the fishes' pituitary gland, inducing LH and FSH production and liberation. Thus, with the application of CCPE, the release of gametes was induced, in less time, possibly by the direct supply of these hormones in the fishes' blood stream, without the need to be produced by the animals.

As known, curimba reproduction is seasonal, and generally synchronized to the environmental factors. In captivity, environmental stimuli are necessary so that an increase in gamete viability and better development of the offspring may occur (Muniz et al., 2008). In addition, when this species is maintained in captivity, the gonads develop to a certain stage, remaining in repose (Murgas et al., 2009), and the hormonal induction must be used to supply the necessary conditions for reproduction.

Since gonadorelin is a hormone which is still under testing, it had not yet been tested in curimba, therefore, it has no pattern dosage. Unlike

gonadorelin, protocols for the application of CCPE have already been defined for various species, this being the main factor which differentiated seminal and oocyte characteristics in this study.

The males induced with gonadorelin, despite having released sperm, had a reduced seminal volume in comparison to the group induced with CCPE. However, spermatic concentration was similar. According to Murgas et al. (2011), most species which receive treatment with the appropriate hormone present a significant increase in semen volume. However, it is known that the volume has no intrinsic biological value, but the number of spermatic cells present. The highest and lowest concentration of spermatozoa observed was, respectively, $93.7 \pm 33.8 \times 10^9$ spermatozoa/mL (CCPE in mL). These concentrations were higher than those found by other authors for this species, such as Felizardo et al. (2010 a) and Viveiros et al. (2009), who reported values of $23.4 \pm 18.4 \times 10^9$ and 16.8×10^9 spermatozoa/mL, respectively. The variation is expected because the spermatozoa concentration may be affected by various factors, such as, environmental changes, reproductive phase, semen volume and the type of hormone used for the induction (Silva et al., 2009).

An influence of the hormone application period was not observed in qualitative and quantitative parameters of curimba gametes. These results disagree to those of Muniz et al. (2008), who demonstrated the influence of the photo period in the ovulatory process of tambaqui (*Colossoma macropomum*), when induced with gonadorelin in different application periods and, according to this author, the intensity of this influence may be dependent of the plasmatic levels of sexual steroids at the moment of the hormonal induction.

The apparent difference between the observations made by Muniz et al. (2008) and this study may be due to the period of induction, which, in this study, was done in HL or HD, instead of at the beginning of the day. In addition, different species of fish may present specific responses to hormonal induction.

The maximum percentage of spermatic anomalies found in the semen of the animals which received CCPE at HD was of $28.5 \pm 5.4\%$. This value is acceptable for the use in fertilization. Miliorini et al. (2011) reported that the critical percentage of total anomalies in curimba semen used in artificial fertilization is inferior to 50%, considering that this

technique involves an elevated proportion of sperm:oocyte in a controlled environment.

The animals induced with gonadorelin did not provide embryo viability, not presenting fertilization and hatching rates. This result is probably related to the quality of the spawning, which, though presented an elevated percentage of oocytes with GVPP, which is the main parameter to obtain fertilization and hatching rates, did not provide adequate conditions for the development of the embryo. Another factor that must be observed is the total concentration of spermatozoa, which, despite not having made significant difference, was shown to be very different between the hormones, which may indicate that, for both sexes, the treatments with gonadorelin did not provide adequate conditions for embryo development.

Another factor which may have contributed for the embryo's not being viable is the hours degree of spawning, in which the fish induced with gonadorelin reproduces with more hours degree than the fish treated with CCPE, and may have entered oocyte degradation process (Murgas et al., 2009). In addition, the used dosage of gonadorelin may have been effective at causing the migration of the germinal vesicle; however,

ineffective at promoting the release of oocytes, since, despite the females ovulating, the extrusion was forced.

5. CONCLUSION

In conclusion, the preliminary and final dosages of gonadorelin, 50 and 70 mg, respectively, were not effective at obtaining induced reproduction in curimba and viable larvae, independent of the application period. On the other hand, CCPE may be applied to male and female curimba, at any application period, without altering the quality of the gametes.

REFERÊNCIAS

- Carolsfeld, J., Harvey, B., Godinho, H.P., Zaniboni-Filho, E., 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J. Fish. Biol.* 63, 472-481.
- Donaldson, E.M., Hunter, G.A., 1983. Induced final maturation, ovulation, and spermiation. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E. M. (Ed.). *Fish Physiology*. Orlando: Academic Press, cap.7, p.352-403.
- Felizardo, V.O., Mello, R.A., Murgas, L.D.S., Andrade, E.S., Drumond, M.M., Rosa, P.V., 2010 a. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 122, 259-263.
- Felizardo, V.O., Murgas, L.D.S., Drumond, M.M., Silva, J.A., 2010 b. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *Rev. Ceres* 57, 648-652.
- Felizardo, V.O., Murgas, L.D.S., Andrade, E.S., López, P.A., Freitas, R.T.F., Ferreira, M.R., 2011. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). *Theriogenology*, v.77, p. 1570–1574, 2012

- Harvey, B., Carolsfeld, J., 1993. Preservation of sperm. In: Harvey, B., Carolsfeld, J. (Eds.) Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa, pp.119-130.
- Maduenho, L.P., Martinez, C.B.R., 2008. Acute effects of diflubenzuron on 387 the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part 388 C: Toxicol. Pharmacol.* 148, 265–272.
- Miliorini, A.B., Murgas, L.D.S., Rosa, P.V., Oberlender, G., Pereira, G.J.M., Costa, D.V., 2011. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquac. Res.* 42, 177-187.
- Muniz, J.A.S.M., Catanho, M.T.J.A., Santos, A.J.G., 2008. Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). *Bol. Inst. Pesca* 34, 205-211.
- Murgas, L.D.S., Drumond, M.M., Machado, G.J.P., Felizardo, V.O., 2009. Manipulação do ciclo e da eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. *Rev. Bras. Reprod. Anim. Supl.* 6, 70-76.
- Murgas, L.D.S., Felizardo, V.O., Ferreira, M.R., Andrade, E.S., Veras G.C., 2011. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 35, 186-191.

- Murgas, L.D.S., Franciscato, R.T., Santos, A.G.O., 2003. Avaliação espermática pós descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). Rev. Bras. Zootec. 32, 1810-1814.
- Murgas, L.D.S., Miliorini, A.B., Freitas, R.T.F., Pereira, G.J.M., 2007. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. Rev. Bras. Zootec. 36, 526-531.
- Sherwood, N., Eiden, L., Brownstein, M., Spiess, J., Rivier, J., Vale, W., 1983. Characterization of a teleost gonadotropin releasing hormone. Proceedings Natural Academy Science, 80, 2794-2748.
- Silva, J.M.A., Murgas, L.D.S., Felizardo, V.O., Pereira, G.J.M., Navarro, R.D., Mello, R.A., 2009. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. Rev. Bras. Saúd. Prod. Anim. 10, 668-677.
- Viveiros, A.T.M., Oliveira, A.V., Maria, A.N., Orfão, L.H., Souza, J.C., 2009. Sensibilidade dos espermatozóides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61, 883-889.
- Viveiros, A.T.M., Godinho, H.P., 2008. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. Fish Physiol. Biochem. 35, 137-150.

Woynarovich, E., 1989. Propagação artificial de peixes de águas tropicais:
manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPQ, 225p.

Zanuy, S., Carrillo, M., 1987. La reproducción de los teleosteos y su aplicación
en acuicultura. In: Monteros, J.E., Labarta, U. (Ed). Reproducción en
Acuicultura. Madrid, Industrias gráficas España, p. 1- 132.

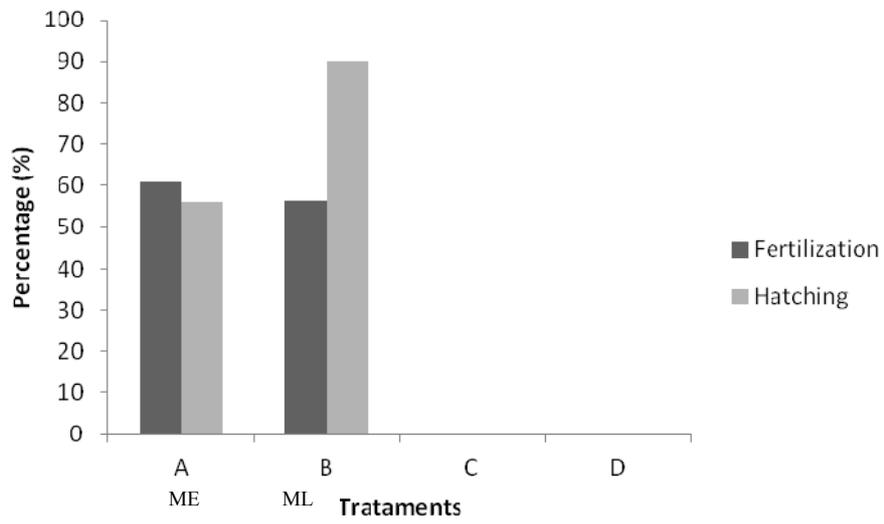


Fig. 1. Fertilization and hatching rates in induced spawning of *P. lineatus*.

Table 1 - Treatments used to induce reproduction of curimba *Prochilodus lineatus* (n = 4 pairs).

Treatments	Hormone	Times of application	Dose	
			1 ^a	2 ^a
A	CPE ¹	ML ²	0,4 mg/kg	4 mg/kg
B	CPE	MD ³		
C	Gonadorelin	ML	50 µg/kg	70 µg/kg
D	Gonadorelin	MD		

¹CPE. Carp pituitary extract;

²ML. Mid light;

³MD. Mid dark.

Table 2. Mean (\pm SD) of several end points of curimba female that underwent hormonal induction with two hormones and two periods of hormone application (2 x 2 factorial), n=16

End point	Period of application	Hormone	
		Carp pituitary extract	Gonadorelin
Spawning+ (N)	ML	4	2
	MD	3	2
Spawning (g) ¹	ML	49.2 \pm 31.6 ^a	4.6 \pm 3.7 ^b
	MD		
Oocytes/g ¹	ML	1865.0 \pm 141.5 ^a	1240 \pm 162.6 ^b
	MD		
Diameter (μ m)	ML	1742 \pm 42	1697 \pm 104
	MD	1677 \pm 196	1659 \pm 49
PPGV (%)	ML	84.2 \pm 19.2	89.2 \pm 10.9
	MD	97.5 \pm 3.5	91.33 \pm 2.3
DHO ¹	ML	239.2 \pm 15.7 ^b	318.8 \pm 15.9 ^a
	MD		

Main effect (P<0.05) of hormone utilized. Means followed by different

lowercase on a same line are statistically different (F test, P<0.05). + positive;

ML. Mid-light; MD. Mid-dark; DHO. degree hours of ovulation; PPGV.

Peripheral position of the germinal vesicle.

Table 3 - Mean and standard deviation of the qualitative parameters of semen male curimba (*Prochilodus lineatus*) after induction with different hormonal treatments, n = 16

End point	Period of application	Hormone	
		CPE	Gonadorelin
Volume (mL) ¹	ML	1.15±0.3 ^a	0.5±0.2 ^b
	MD		
Motility (%)	ML	100.0±0.0	100.0±0.0
	MD	100.0±0.0	100.0±0.0
Duration (s)	ML	86.7±40.2	69.2±14.6
	MD	112.2±48.2 ^a	43.5±6.6 ^b
Concentration (sptz x10 ⁹ /mL)	ML	57,8±30,8	62,5±20,0
	MD	93,7±33,8	82.0±39,0
Abnormal sperm (%)	ML	25.5±6.9	18.5±7.5
	MD	28.5±5.4	25.2±11.8

¹ Main effect (P<0.05) of hormone utilized. Means followed by different lowercase on a same line are statistically different (F test, P<0.05). CPE: Carp pituitary extrat; sptz. sperm; ML. Mid-light; MD. Mid-dark.