



ANTÔNIO CARLOS SILVEIRA GONÇALVES

**OSMOLALIDADE NA MOTILIDADE
ESPERMÁTICA DE *Prochilodus lineatus* E *Brycon
orbignyanus*, E GnRH α E ANTI-DOPAMINA NA
INDUÇÃO DA ESPERMIAÇÃO E DESOVA DE
*Prochilodus lineatus***

LAVRAS – MG

2013

ANTÔNIO CARLOS SILVEIRA GONÇALVES

OSMOLALIDADE NA MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE *Prochilodus lineatus* E *Brycon orbignyanus*, E GnRH_a E ANTI-DOPAMINA NA INDUÇÃO DA ESPERMIAÇÃO E DESOVA DE *Prochilodus lineatus*

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

Orientadora

Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros

LAVRAS – MG

2013

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

Gonçalves, Antônio Carlos Silveira.

Osmolalidade na motilidade espermática de *Prochilodus lineatus* e *Brycon orbignyanus*, e GnRH_a e anti-dopamina na indução da espermição e desova de *Prochilodus lineatus* / Antônio Carlos Silveira Gonçalves. – Lavras : UFLA, 2013.

99 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros.

Bibliografia.

1. Ativação espermática. 2. Characiformes. 3. Fertilização. 4. Ovaprim®. 5. Qualidade dos gametas. 6. Reprodução induzida. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.37520416

ANTÔNIO CARLOS SILVEIRA GONÇALVES

OSMOLALIDADE NA MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE *Prochilodus lineatus* E *Brycon orbignyanus*, E GnRH α E ANTI-DOPAMINA NA INDUÇÃO DA ESPERMIAÇÃO E DESOVA DE *Prochilodus lineatus*

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

APROVADA em 11 de junho de 2013.

Dr. Marcelo de Castro Leal	DZO/UFLA
Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas	DZO/UFLA
Dra. Laura Helena Órfão	UNIFENAS
Dra. Ziara Aparecida Isaú	IFSULDEMINAS/Inconfidentes

Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros
Orientadora

LAVRAS – MG

2013

À minha família, em especial aos meus pais (Antônio e Raquel),
melhores companheiros e maiores exemplos de vida,
que sempre acreditaram em meus sonhos e ideais;
Às minhas queridas irmãs (Aline e Alessandra),
orgulhos de minha vida.
À Deus, por cada
dia vivido.

“Os amo e admiro!”

DEDICO

À Lígia, meu grande amor, por todo companheirismo,
carinho, atenção, paciência e apoio incondicional;
À minha querida filha Clarice, meu anjinho;
presente de Deus para abençoar minha
vida, com todo amor demonstrado
em cada sorriso, cada olhar;
o que sinto por você está
além de minha
existência.

“Minha família, sentimento maior, fonte de inspiração e forças!”

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda presença em minha vida e por guiar meus passos;

À Nossa Senhora de Fátima e São Francisco de Assis, por sempre estarem ao meu lado e atenderem minhas preces;

À minha amiga e orientadora, Profa Ana Viveiros, por todo apoio, conselhos, ensinamentos, oportunidade de crescimento profissional e confiança em meu trabalho;

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade oferecida de realização do doutorado e por toda minha formação acadêmica;

À professora Elizabeth Romagosa, pela coorientação, pelos ensinamentos, pela amizade e grande incentivo em meu doutorado;

Ao Dr. Marcelo C. Leal e professores Rilke T. F. de Freitas, Laura H. Órfão e Ziara A. Isaú, integrantes de minha banca de defesa, por todo auxílio, amizade e ensinamentos transmitidos durante o curso;

Aos professores Márcio G. Zangeronimo e Priscila V. Rosa por toda atenção, amizade e incentivo;

Aos pesquisadores e companheiros de experimento, Daniele Rossetto, Isabel Carvalho, Isabel Lopez, Lays Pereira, Marina Lemes, Tais Taffarel, Thales França e Thatijanne Carvalho. por toda amizade, companheirismo e auxílio em campo e no laboratório;

Às minhas amigas, que acompanharam de perto minhas jornadas de “piracema”, Ariane F. Nascimento, Isabela M. Di Chiacchio e Mariana Hamaue, por toda prontidão, paciência, companheirismo e carinho;

Aos amigos: Adriano C. Costa, pelo auxílio estatístico; Natália M. N. Mourad e Rafael V. Reis Neto, pelo apoio, incentivo e prontidão;

Ao secretário da Pós-Graduação em Zootecnia, Carlos H. de Souza, pela colaboração e amizade;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Agência Nacional de Energia Elétrica e Furnas Centrais Elétricas S.A. (ANEEL P&D Furnas), pelo apoio financeiro e suporte à realização dos projetos;

Aos biólogos, Dirceu M. Ribeiro e Marcília B. Goulart (Furnas) e técnicos Gilson A. Azarias e Jaílson M. Silva (CEMIG), pela amizade, prontidão e auxílio na realização dos experimentos nas estações de piscicultura;

Às estações de piscicultura de Furnas Centrais Elétricas S.A. e Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), por permitirem e auxiliarem na execução dos experimentos;

A todos que participaram ou participam de minha vida, que contribuíram ou contribuem para meu crescimento pessoal e profissional,

Muito Obrigado!!!

RESUMO GERAL

O curimatá *Prochilodus lineatus* e a piracanjuba *Brycon orbignyanus* são peixes Characiformes, nativos da América do Sul, com grande potencial para a aquicultura. No estudo inicial (artigo 1) foram avaliadas soluções de NaCl, glicose e BTS[®] (Minitub[®]), preparadas em 10 diferentes osmolalidades (45 a 450 mOsm/kg) sobre a iniciação ou supressão da motilidade espermática em *P. lineatus* e *B. orbignyanus*. Quando presente, a taxa de motilidade foi determinada a 0, 30 e 120 segundos, enquanto o vigor espermático foi determinado a 0 e 30 segundos pós-ativação. A osmolalidade, mas não a composição da solução, afetou a motilidade e o vigor espermático. Soluções até 270 mOsm/kg para *P. lineatus* e até 180 mOsm/kg para *B. orbignyanus* induziram motilidade em pelo menos 60% dos espermatozoides, com vigor mínimo de 3,0, e foram classificadas como agentes ativadores. Em relação à duração da motilidade, soluções entre 135 e 225 mOsm/kg para *P. lineatus* e a 135 mOsm/kg para *B. orbignyanus* induziram maior motilidade do sêmen. Por outro lado, soluções variando de 360 a 450 mOsm/kg em *P. lineatus* e 270 a 450 mOsm/kg em *B. orbignyanus* suprimiram a motilidade em pelo menos 95% dos espermatozoides e foram classificadas como meios imobilizadores. A osmolalidade do meio (solução) é o fator chave na iniciação ou supressão da motilidade espermática em *P. lineatus* e *B. orbignyanus*. Para a reprodução artificial (artigo 2), a eficiência do Ovaprim[®] como indutor de desova e espermição foi comparada ao extrato de hipófise (EH) em *P. lineatus*. Fêmeas receberam 0,5 + 5,0 mg EH/kg; 0,05 + 0,45 mL Ovaprim[®]/kg; ou 0,125 + 0,375 mL Ovaprim[®]/kg. Machos receberam 0,4 + 4,0 mg EH/kg; ou 0,4 mg EH/kg + 0,25 mL Ovaprim[®]/kg. Não houve diferença entre os tratamentos Ovaprim[®] e EH, para fêmeas (qualidade dos ovócitos e de desova) e machos (qualidade espermática). Os valores médios para fêmeas foram: 242 g de peso de desova, 15% de índice de desova, 1.209 ovócitos/g de ova, 284.539 ovócitos/fêmea, 183 ovócitos/g de peso corporal, 1,18 mm de diâmetro do ovócito, 49% de taxa de fertilização, 43% de taxa de eclosão e 89% de larvas normais. Os valores médios para machos foram: volume de 3,0 mL, $14,9 \times 10^9$ espermatozoides/mL, osmolalidade de 283 mOsm/kg, pH de 7,4, 71% de espermatozoides móveis, velocidade curvilínea de 217 $\mu\text{m}/\text{segundo}$, velocidade linear de 102 $\mu\text{m}/\text{segundo}$ e velocidade média de percurso de 189 $\mu\text{m}/\text{segundo}$. Ovaprim[®] pode ser utilizado como indutor da reprodução em *P. lineatus*, sem perda da qualidade dos gametas.

Palavras-chave: Ativação espermática. Characiformes. Fertilização. Ovaprim[®]. Qualidade dos gametas.

GENERAL ABSTRACT

The streaked prochilod *Prochilodus lineatus* and the piracanjuba *Brycon orbignyanus* are Characiformes fish, native to South America, with great potential for aquaculture. In the initial study (article 1) we evaluated NaCl, glucose and BTS™ (Minitub™) solutions, prepared in 10 different osmolalities (45 to 450 mOsm/kg) over the initiation or suppression of sperm motility in *P. lineatus* and *B. orbignyanus*. When present, motility rate was determined at 0, 30 and 120 seconds, while the spermatic motility quality score was determined at 0 and 30 seconds post-activation. Osmolality, but not solution composition, affected sperm motility and motility quality score. Solutions up to 270 mOsm/kg for *P. lineatus* and 180 mOsm/kg for *B. orbignyanus* induced motility in at least 60% of the spermatozoa, with a minimum quality score of 3.0, and classified as activating agents. In relation to duration of motility, solutions between 135 and 225 mOsm/kg for *P. lineatus* and at 135 mOsm/kg for *B. orbignyanus* induced higher sperm motility. On the other hand, solutions ranging from 360 to 450 mOsm/kg in *P. lineatus* and 270 to 450 mOsm/kg in *B. orbignyanus* suppressed motility in at least 95% of the spermatozoa and were classified as immobilizing media. The osmolality of the medium (solution) is the key factor in the initiation or suppression of sperm motility in *P. lineatus* and *B. orbignyanus*. For artificial reproduction (article 2), the efficiency of Ovaprim™ in inducing spawning and spermiation was compared to pituitary extract (PE) in *P. lineatus*. Females received 0.5 + 5.0 mg PE/kg; 0.05 + 0.45 mL Ovaprim™/kg; or 0.125 + 0.375 mL Ovaprim™/kg. Males received 0.4 + 4.0 mg PE/kg; or 0.4 mg PE/kg + 0.25 mL Ovaprim™/kg. There was no difference between the Ovaprim™ and PE treatments, for females (oocytes and spawning quality) and males (sperm quality). The mean values for females were: 242 g of spawning weight, 15% spawning index, 1,209 oocytes/g of ova, 284,539 oocytes/female, 183 oocytes/g body weight, 1.18 mm of oocyte diameter, 49% fertilization rate, 43% hatching rate and 89% normal larvae. The mean values for males were: volume of 3.0 mL, 14.9×10^9 sperm/mL, osmolality of 283 mOsm/kg, pH of 7.4, 71% motile spermatozoa, curvilinear velocity of 217 $\mu\text{m/s}$, straight-line velocity of 102 $\mu\text{m/s}$ and average path velocity of 189 $\mu\text{m/s}$. Ovaprim™ may be used as an inducer of *P. lineatus* reproduction, without loss of gamete quality.

Keywords: Sperm activation. Characiformes. Fertilization. Ovaprim™. Gamete quality.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Exemplar de curimatá <i>P. lineatus</i>	18
Figura 2	Exemplar de piracanjuba <i>B. orbignyanus</i>	20
Figura 3	Eventos fisiológicos e endócrinos no controle da reprodução em peixes.....	21
Figura 4	Técnicas de desova (A) e espermição (B) por extrusão em <i>B. orbignyanus</i>	28
Figura 5	Avaliação do número de ovócitos por grama desovada em <i>P. lineatus</i>	29
Figura 6	Larvas eclodidas (A) e ovos gorados (B) de <i>B. orbignyanus</i> , observados em estereomicroscópio	30
Figura 7	Sistema computadorizado de análise do sêmen (CASA).....	32
Figura 8	Análise da concentração espermática de <i>P. lineatus</i> em câmara de Neubauer, por meio do microscópio de luz (400 x).....	34

ARTIGO 1

Figure 1 Motility rate (A) and quality score (B) for sperm from *Prochilodus lineatus* (n = 14) diluted in activating agents at osmolalities ranging from 45 to 270 mOsm/kg. Motility rate was determined at 0, 30, and 120 s post-activation, while quality score was determined at 0 and 30 s post-activation. Motility quality score was assigned using an arbitrary grading system ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming sperm). Sperm was diluted in three different solution compositions (NaCl, glucose, and BTS™). Because there was no effect of composition on motility rate or quality score, data were pooled. * Means followed by an asterisk on each line were significantly higher than the others (P < 0.05; Scott-Knott test)..... 61

Figure 2 Motility rate (A) and quality score (B) for sperm from *Brycon orbignyanus* (n = 7) diluted in activating agents at osmolalities ranging from 45 to 180 mOsm/kg. Motility rate was determined at 0, 30, and 120 s post-activation, while quality score was determined at 0 and 30 s post-activation. Motility quality score was assigned using an arbitrary grading system ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming sperm). Sperm was diluted in three different solution compositions (NaCl, glucose, and BTS™). Because there was no effect of composition on motility rate or quality score, data were pooled. * Means followed by an asterisk on each line were significantly higher than the others (P < 0.05; Scott-Knott test)..... 62

ARTIGO 2

Figure 1 Frequency distribution of stripped oocytes diameter of *P. lineatus* after pituitary extract (PE) or Ovaprim™ treatment. Lines with different symbols indicate the three different treatments: PE at 0.5 + 5.0 mg/kg, Ovaprim™ at 0.05 + 0.45 mL/kg (dose 1) and Ovaprim™ at 0.125 + 0.375 mL/kg (dose 2)..... 84

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Table 1 Body weight and some fresh sperm features in *Prochilodus lineatus* originated from two different fish culture stations (Furnas and CEMIG) and *Brycon orbignyanus* from the Furnas station after carp pituitary treatment (cPE)..... 57
- Table 2 Motility rate (expressed as percentage of motile sperm) in sperm from *Prochilodus lineatus* (n = 14 males) and *Brycon orbignyanus* (n = 7 males) diluted in three different solution compositions (NaCl, glucose and BTS™) at osmolalities ranging from 45 to 450 mOsm/kg and observed immediately under a light microscope. *P. lineatus* males originated from two different fish culture stations (Furnas and CEMIG) and *B. orbignyanus* males originated only from the Furnas station..... 59
- Table 3 Reported seminal plasma osmolality and solutions considered as sperm activating agents and immobilizing media for some fish species..... 64

ARTIGO 2

- Table 1 Female body weight (BW), oocyte, egg and embryo quality (mean ± SD) of *Prochilodus lineatus* after pituitary extract (PE) or Ovaprim™ treatment..... 83
- Table 2 Male body weight and sperm quality (mean ± SD) of *Prochilodus lineatus* after pituitary extract (PE) or Ovaprim™ treatment. All males received an initial dose of PE at 0.4 mg /kg, 12 h before PE or Ovaprim™ treatment..... 86

Table 3	Oocyte quality of Characiformes fish species after induction with gonadotropin releasing hormone (GnRH or LHRH) analog combined or not with a dopamine antagonist (domperidone or metoclopramide), and compared to pituitary extract (PE).....	89
Table 4	Sperm quality of Characiformes fish species induced with a gonadotropin releasing hormone (GnRH or LHRH) analog combined or not with a dopamine antagonist (domperidone), and compared to pituitary extract (PE).....	93

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 15
2	REFERENCIAL TEÓRICO 17
2.1	Espécies 17
2.1.1	<i>Prochilodus lineatus</i> 17
2.1.2	<i>Brycon orbignyana</i> 19
2.2	Reprodução induzida em peixes migradores 20
2.2.1	Hipofiseação 22
2.2.2	GnRH e seus análogos 24
2.3	Desenvolvimento gonadal e fertilização 25
2.4	Parâmetros de qualidade dos gametas 29
2.5	Influência do meio (solução) sobre a qualidade seminal 34
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS 37
	REFERÊNCIAS 38
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS 46
	ARTIGO 1 Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (<i>Prochilodus lineatus</i>) and piracanjuba (<i>Brycon orbignyana</i>)..... 46
	ARTIGO 2 Gamete quality of streaked prochilod <i>Prochilodus lineatus</i> (Characiformes) after GnRH _a and dopamine antagonist treatment 73

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Com a grande expansão da piscicultura comercial, muitas espécies de peixes, comumente encontradas em rios, são criadas em cativeiro, nos quais, muitas vezes, não encontram condições adequadas para a reprodução. Isso ocorre, principalmente, com as espécies que têm a característica de migrar em determinados meses do ano, quando passam por estímulos hormonais e ambientais, até chegarem às calhas dos rios ou nos grandes afluentes, onde ocorre a desova. Muitas dessas espécies, conhecidas como reofílicas, ou espécies de piracema, têm ampla importância comercial e são produzidas em grande quantidade, enquanto outras, devido à sobrepesca e outras ações antropogênicas (assoreamento de rios, construções de barragens, diminuição de matas ciliares, aumento da poluição e introdução de espécies exóticas), têm seu número cada vez mais reduzido. Assim, torna-se necessário a adoção de práticas que atenuem esse problema, como a reprodução artificial em laboratórios e a despesca de alevinos.

Para a maioria das espécies de peixes migratórios criadas em cativeiro, só é possível a reprodução se esta for induzida com hormônios exógenos. Nesses animais, os fatores ambientais desencadeantes de hormônios reprodutivos do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal estão desligados como consequência de um ambiente pouco variável. Dessa forma, mesmo que as gônadas cresçam e se desenvolvam normalmente, os processos de maturação final dos ovócitos, ovulação e desova podem não ocorrer. Nos machos, a função básica da indução hormonal é aumentar o volume seminal, garantindo maior fluidez do sêmen produzido.

A prática mais comum para induzir a reprodução artificialmente em peixes é a aplicação de extrato bruto de hipófise (EBH). Entretanto, o uso de EBH está associado a vários problemas, como grande variabilidade no conteúdo de hormônio luteinizante (LH), presença de outros hormônios que não induzem reprodução e potencial para transmissão de doenças. Estes fatores levaram à busca de outras técnicas de indução para substituir o EBH, mantendo a eficiência reprodutiva da espécie. Como exemplo, estão as associações entre análogos de GnRH (GnRHa) e anti-dopaminérgicos, como o Ovaprim[®] (GnRHa de salmão e domperidona; Syndel, Canadá), que têm sido cada vez mais efetivas na indução reprodutiva de espécies Characiformes, Cypriniformes e Siluriformes, entre outras.

A qualidade dos gametas e os métodos de fertilização artificial têm sido frequentemente avaliados, principalmente por meio de parâmetros que influenciam diretamente as taxas de fertilização, como motilidade e duração da motilidade espermática, concentração espermática, relação espermatozoide /ovócito, índice de desova, diâmetro do ovócito, posição da vesícula germinativa, dentre outros. Todos os parâmetros analisados devem influenciar a qualidade dos ovos fertilizados e, conseqüentemente, a qualidade das larvas eclodidas.

Assim, com o presente trabalho objetivou-se obter procedimentos mais eficientes para a reprodução artificial de peixes migradores, desde a utilização de meios (soluções) que auxiliem os processos de ativação e supressão da motilidade espermática em *Prochilodus lineatus* e *Brycon orbignyana*, até a avaliação da qualidade de desova e espermição em *P. lineatus* após indução com tratamentos hormonais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Espécies

2.1.1 *Prochilodus lineatus*

O curimatá, *Prochilodus lineatus* (Figura 1) pertencente à ordem Characiformes, família Prochilodontidae, é um peixe de ampla ocorrência na bacia do Paraná-Paraguai e do rio Paraíba do Sul e é um dos mais importantes para a pesca na bacia do Grande (CASTRO; BEGOSSI, 1995). Esta espécie é também conhecida como curimba, grumatá, papa-terra ou streaked prochilod (em inglês). O *P. lineatus* apresenta importância econômica e social para a pesca artesanal de subsistência e esportiva, além de possuir uma carne saborosa (BARBIERI et al., 2004). O macho reproduz-se aos dois anos de idade, com 24 cm, e a fêmea, aos três anos, com 31 cm de comprimento. Quando adulto, o *P. lineatus* pode atingir até 6 kg de peso corporal e 70 cm de comprimento (COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS - CEMIG; FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS - CETEC, 2000). Esta espécie caracteriza-se pela boca protátil que permite a exploração de substratos diferenciados no sedimento (FURUYA, 2001). Quanto ao hábito alimentar, esses peixes são iliófagos ou detritívoros, ou seja, alimentam-se de organismos bentônicos (larvas de insetos; larvas e ovos de moluscos, crustáceos, entre outros organismos) e detritos orgânicos comumente encontrados na água (resíduos planctônicos, fezes de outros peixes, entre outros) (CASTAGNOLLI, 1992; PROENÇA; BITTENCOURT, 1994).



Figura 1 Exemplar de curimatá *P. lineatus*

Fonte: Viva Terra (2013)

O *P. lineatus* encontra-se, geralmente, em ambiente com águas mais lentas. Porém, na época de reprodução (novembro a janeiro), realiza migrações em massa até as áreas de desova (CEMIG; CETEC, 2000). Esta é uma das espécies de peixes de água doce com maior significado na piscicultura comercial, sendo muito apreciado na culinária dos estados da região Nordeste do Brasil. As estações de piscicultura têm grande interesse no sucesso da sua reprodução, uma vez que as larvas de *P. lineatus* servem de alimento para espécies carnívoras de grande importância comercial, como, por exemplo, o dourado *Salminus brasiliensis* (CEMIG; CETEC, 2000) ou passíveis de extinção, como a piracanjuba *Brycon orbignyanus* e o jaú *Zungaro jahu* (VIVEIROS et al., 2009). Essa espécie é também muito utilizada por usinas hidrelétricas em programas de repovoamento de reservatórios, além de servir como espécie-modelo no desenvolvimento de pesquisas em biotecnologia reprodutiva, dadas sua elevada prolificidade e facilidade de manejo (VIVEIROS et al., 2010).

2.1.2 *Brycon orbignyanus*

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Figura 2) pertencente à ordem Characiformes, família Characidae, é um peixe migratório nativo das bacias formadas pelos rios Uruguai e Paraná, muito apreciado pelo valor e sabor de sua carne (GODOY, 1986). Esta espécie tem despertado grande interesse não só por sua carne de excelente qualidade, mas também por ser muito apreciada em pescas esportivas devido ao seu comportamento agressivo quando fígado, além de apresentar rápido crescimento e facilidade de cultivo (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000). O *B. orbignyanus* é uma espécie de hábito alimentar onívoro, alimentando-se de peixes (fases iniciais de vida), insetos e sementes. O macho reproduz-se a partir de dois anos de idade, com 20 cm de comprimento, apresentando como característica sexual secundária aspereza na nadadeira anal, resultante de pequenas espículas que aparecem na época da reprodução; já a fêmea se reproduz a partir do terceiro ano de idade, com 25 cm de comprimento. Esta espécie apresenta corpo fusiforme e comprido e a boca é ampla e terminal, o dorso é castanho escuro e a nadadeira caudal apresenta cor vermelha com uma faixa mediana bem escura (CEMIG; CETEC, 2000).



Figura 2 Exemplar de piracanjuba *B. orbignyanus*

Fonte: Terra da Gente (2013)

O *B. orbignyanus* prefere ambientes lóticos de águas claras, sendo encontrada nos locais em que as árvores se deitam sobre o rio, onde obtêm os frutos que lhes servem de alimento. A migração rio acima se dá nos meses de setembro e outubro, culminando com a desova entre novembro e janeiro (CEMIG; CETEC, 2000). Entretanto, o *B. orbignyanus* encontra-se ameaçado de extinção por não conseguir realizar migração reprodutiva, devido ao grande número de barragens hidrelétricas encontradas nos rios e à degradação ambiental (PAIVA, 1982; VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000). Existe um grande interesse na utilização destes briconídeos tanto para produção em pisciculturas comerciais, quanto para conservação da biodiversidade.

2.2 Reprodução induzida em peixes migradores

A reprodução de peixes teleósteos na natureza é regulada por fatores endógenos, presentes nos componentes do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, em interação com o meio ambiente (Figura 3). Estímulos ambientais, determinados pelos ritmos circadianos, convergem para o hipotálamo. O hipotálamo é uma região específica do cérebro que, entre outros neuro-hormônios, secreta o

hormônio liberador de gonadotrofinas - GnRH, e a dopamina, que, respectivamente, estimula e inibe a liberação das gonadotrofinas hipofisárias - hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). O FSH é responsável pela liberação de estradiol pelo ovário (entrada de vitelogenina no ovócito), pelo crescimento gonadal e pela gametogênese, enquanto o LH é responsável por secreção de esteroides, maturação final dos gametas e sua posterior liberação. Os esteroides realizam, via corrente sanguínea, uma retroalimentação negativa no hipotálamo e hipófise modulando as funções subsequentes desses órgãos (VAZZOLER, 1996).

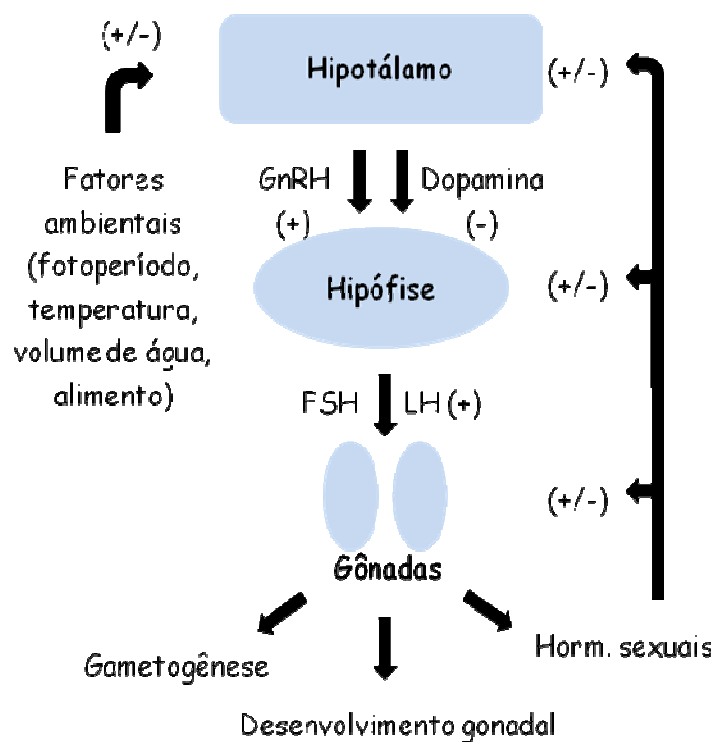


Figura 3 Eventos fisiológicos e endócrinos no controle da reprodução em peixes

Fonte: Adaptado de Viveiros, Leal e Sallum (2011)

A falta de maturação final de ovócitos, ovulação, desova e espermiacão em peixes cultivados resultam do fato de que reprodutores em cativeiro não experimentam as condições ambientais da desova. Muitos dos peixes comercialmente importantes migram de centenas a milhares de quilômetros para alcançar os nichos ambientais, onde as condições são ótimas para a sobrevivência de sua prole. Durante esta migração, os peixes experimentam várias mudanças ambientais, como por exemplo, a salinidade da água, química, temperatura, profundidade e substrato (ZOHAR; MYLONAS, 2001). Estas mudanças combinadas desencadeiam os processos endócrinos que resultam em maturação final de ovócitos e ovulação, levando a uma desova bem sucedida (LAM, 1983; STACEY, 1984). A maioria das pesquisas sobre o uso de hormônios para controlar o ciclo reprodutivo de peixes na aquicultura têm focado na indução de maturação final de ovócitos, ovulação, espermiacão e desova de peixes que não completam esses processos em cativeiro (ZOHAR; MYLONAS, 2001).

O procedimento de seleção dos reprodutores é fator crucial para obtenção de uma indução hormonal bem sucedida. Para isso, a seleção será realizada de acordo com as características citadas por Woynarovich e Hóvath (1983). Nas fêmeas, as características incluem abdômen abaulado e macio ao toque, papila urogenital proeminente e de coloração rosada ou avermelhada e orifício urogenital ligeiramente aberto. Nos machos ocorre liberação de sêmen após pequena compressão na cavidade celomática.

2.2.1 Hipofisacão

Os primeiros trabalhos de indução à desova de peixes reofílicos foram desenvolvidos paralelamente na Argentina (HOUSSAY, 1930) e no Brasil (IHERING, 1937), quando foram obtidos resultados positivos de indução à

maturação final e desova de peixes migradores, a partir da aplicação de hormônios naturais presentes na hipófise de peixes maduros. Essa técnica continua sendo uma das alternativas utilizadas para induzir a reprodução de peixes migradores em todo mundo, sendo conhecida como “hipofisação” (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007). No método original de hipofisação, utilizava-se o triturado de hipófise fresca em suspensão, obtidos a partir de doadores coletados, em época de piracema (IHERING, 1937). Com o passar dos anos, pesquisadores aprimoraram a técnica e passaram a utilizar o extrato bruto de hipófise (EBH) centrifugada a partir de hipófises conservadas a seco, após terem sido desidratadas em acetona. A carpa, um peixe não reofílico, de desova parcial/total, é utilizada como principal doador (STREIT JUNIOR et al., 2002).

O método de hipofisação difundiu-se no mundo inteiro com a intensificação da piscicultura, o que propiciou o aperfeiçoamento da técnica, com variações da origem, preparação e purificação do EBH (STREIT JUNIOR et al., 2002). A popularização desta técnica é justificada por apresentar inúmeras vantagens em relação a outros métodos de indução reprodutiva. Segundo Donaldson e Hunter (1983), o método de hipofisação é simples, requer pouco material hipofisário para manipulação, não é necessário resfriar o material preparado, além do cálculo de dosagem ser baseado em uma relação entre peso corporal do doador da hipófise e do receptor do EBH. Os mesmos autores ainda mencionam que a presença de outros hormônios no EBH pode ter efeito sinérgico na indução. Porém, esses autores citaram que o método possui algumas desvantagens, por exemplo, 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. Reay (1989) definiu que o sucesso do método de hipofisação depende de uma série de fatores,

como temperatura, estágio de maturação ovocitária, condição geral do doador e do receptor de hipófise. Embora a hipofisação tenha sido modificada e adaptada por vários autores, ela consiste de uma dose dividida em duas administrações, a 6-24 horas de intervalo (ZANIBONI FILHO; BARBOSA, 1996). De modo geral, a hipofisação é muito utilizada em espécies Characiformes, como peixes da família Anostomidae, Characidae e Prochilodontidae, além de espécies Siluriformes, como peixes da família Pimelodidae (VIVEIROS; GODINHO, 2009), dentre outros. Entretanto, o uso do EBH foi recentemente proibido no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por falta de registro, devendo ser substituído por outro hormônio indutor.

Atualmente, os meios para reprodução artificial de peixes são variados, dentre os quais se pode destacar o uso do hCG (gonadotrofina coriônica humana), GnRH ou LHRH (hormônio liberador de gonadotrofina), análogos de GnRH (GnRHa), antagonista de dopamina (anti-dopaminérgicos) e associação de GnRHa com antagonista de dopamina (ZOHAR; MYLONAS, 2001).

2.2.2 GnRH e seus análogos

O GnRH é uma molécula simples que pode ser sintetizada, produzindo-se análogos (GnRHa) 50 a 100 vezes mais potentes que as formas naturais (HARVEY; CAROLSFELD, 1993). A regulação de gonadotrofinas promovida pelo controle entre GnRHa e dopamina, tem se tornado uma base para técnicas de reprodução induzida em peixes altamente eficiente (ARIAS ACUÑA; HERNÁNDEZ RANGEL, 2009). Análogos do GnRH vem sendo testados na reprodução artificial de peixes, pois esses compostos apresentam vantagens em relação às gonadotrofinas, tais como estimulação da maturação gonadal, incapacidade de desencadear resposta imune, melhora na integração com funções fisiológicas que afetam processos endócrinos e diminuição do risco de

transmissão de doenças aos reprodutores (ZOHAR; MYLONAS, 2001). Apesar da existência de vários análogos no mercado, os mais utilizados para indução à maturação final de peixes são os análogos dos hormônios liberadores de gonadotrofina (GnRH_a) de mamíferos e de salmão (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007).

O Ovaprim[®] (Syndel Laboratories Ltd., Canadá) é um produto que contém hormônio liberador de gonadotrofinas análogo ao do salmão *Salmo salar* (sGnRH_a; D-Arg⁶-PrO⁹-NET) na concentração de 20 µg/mL e a domperidona, um anti-dopaminérgico, a 10 mg/mL. Ovaprim[®] é usado para induzir a ovulação e espermiacão em peixes. Este produto é mais comumente manipulado por injeção via intramuscular ou intraperitoneal (intracelomática) rotulada na taxa de dosagem de 0,5 mL/kg (= 0,5 µL/g) (HILL et al., 2009). Ovaprim[®] tem sido utilizado em uma grande variedade de peixes de produção aquícola (INGRAM et al., 2005; MOHD-ZAINI; SAADON; DAN OMAR, 1994), pesquisa (ARIAS ACUÑA; HERNÁNDEZ RANGEL, 2009; CEJKO et al., 2012; HILL et al., 2005; PINILLOS et al., 2002; VIVEIROS et al., 2002), de conservação (EENENNAAM et al., 2001; SARKAR et al., 2006), e para fins veterinários (YANONG et al., 2003).

2.3 Desenvolvimento gonadal e fertilização

Para o sucesso da reprodução, a sincronia entre os processos fisiológicos de maturação gonadal com as condições ambientais favoráveis faz-se necessária. Uma série de mecanismos de ajuste está envolvida no processo de maturação gonadal e desova, basicamente por meio de controles hormonais. No início do desenvolvimento gonadal ocorre um aumento no nível de gonadotrofina na hipófise e no plasma, servindo provavelmente para recrutar os ovócitos e iniciar a vitelogênese no período reprodutivo corrente (ZOHAR, 1989).

Depois de concluída a vitelogênese, a atividade ovariana se torna mais reduzida e permanece em sintonia com a adequação das condições ambientais, garantindo assim, que a liberação dos ovócitos coincida com o período em que as características ambientais estejam mais adequadas, para propiciar a máxima sobrevivência da prole. Esta fase é conhecida como “período de dormência” e sua duração varia de uma espécie para outra, sendo observado, para peixes brasileiros, um período desde poucas semanas até alguns meses. A extensão do período de dormência é muito afetada pelas condições em que os reprodutores são mantidos, tais como: qualidade de água, alimentação e a frequência de manejo. A aplicação das técnicas convencionais de indução hormonal é indicada para peixes maduros, ou seja, aqueles que se encontram na “fase de dormência”. Nessa fase, a vitelogênese está completa nos ovócitos, sendo necessária a indução hormonal para garantir a maturação final e desova, que consiste basicamente na migração e a posterior desintegração da vesícula germinal, o rompimento do envelope folicular e a consequente liberação dos ovócitos na luz do ovário, seguido pela eliminação dos ovócitos. Para os machos, a função básica da indução hormonal é o aumento do volume de sêmen, que está mais associado com uma maior fluidez do sêmen produzido do que com o aumento do número de espermatozoides (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007).

Várias espécies de peixes submetidas ao tratamento de indução hormonal iniciam a liberação dos ovócitos, quando na presença de machos, após a ovulação. Neste caso, os ovócitos são fertilizados pelos machos dentro do tanque sem a interferência do produtor. A definição de uma nomenclatura para caracterizar essa modalidade de desova tem sido controversa, sendo recomendada “reprodução induzida com desova natural” ou ainda, “desova semi-natural”. Apesar disso, algumas espécies de peixes em condições de cativeiro não liberam os ovócitos espontaneamente após a ovulação, sendo necessária a retirada dos gametas por extrusão (WOYNAROVICH; HORVÁTH,

1983). Essa é a técnica mais utilizada no Brasil, possibilitando bons resultados para diferentes espécies de peixes (SATO, 1999; ZANIBONI FILHO; BARBOSA, 1996), apresentando a vantagem de reduzir a mão-de-obra operacional para a retirada dos ovócitos e permitir um maior controle da produção. Outras vantagens da desova por extrusão são destacadas por Harvey e Carolsfeld (1993), entre elas: dispensa a necessidade de tanques especiais para a desova, facilita o manejo dos ovos fertilizados, permite o manejo dos gametas para fins de melhoramento genético, utiliza mais eficientemente o sêmen quando este é escasso (por meio de diluição ou de preservação) e permite o cruzamento entre espécies e entre gêneros diferentes.

A técnica de desova por extrusão (Figura 4A) consiste na retirada das fêmeas imediatamente após a ovulação, quando os ovócitos estão soltos na luz do ovário, e por meio de pressão abdominal induzir a saída dos ovócitos pela papila urogenital. O mesmo procedimento é utilizado para a retirada do sêmen (Figura 4B), sendo ambos os gametas recolhidos em recipientes para posterior mistura. É necessário determinar o momento exato da ovulação das fêmeas para garantir a obtenção de gametas de boa qualidade (BROMAGE et al., 1994). A retirada dos ovócitos antes ou depois de determinado tempo da ovulação pode comprometer a qualidade das larvas e proporcionar baixas taxas de fertilização (HIROSE; ISHIDA; SAKAI, 1977). Os espermatozoides permanecem imóveis no testículo dos peixes devido à elevada concentração de potássio, de forma que, imediatamente após entrarem em contato com a água o potássio é diluído e as células são ativadas (ALAVI; COSSON, 2006).

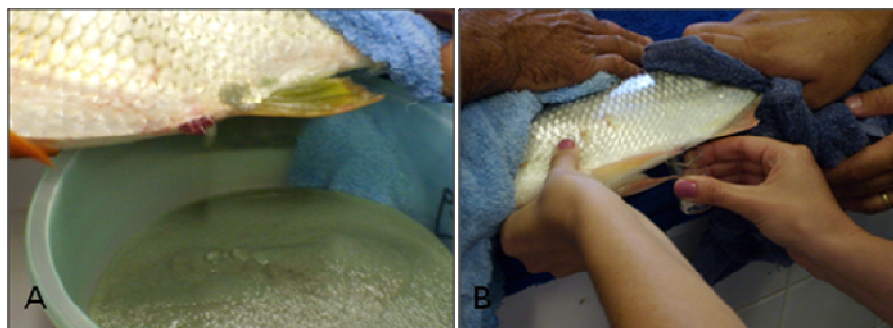


Figura 4 Técnicas de desova (A) e espermição (B) por extrusão em *B. orbignyana*

A duração da motilidade do sêmen varia entre as diferentes espécies de peixes, porém, geralmente, é inferior a um minuto (HARVEY; CAROLSFELD, 1993). De modo semelhante, os ovócitos de diferentes espécies são ativados pelo contato com a água, devendo ser fertilizados imediatamente. Considerando as características fisiológicas dos gametas, a fertilização a seco é o melhor método, onde ovócitos e espermatozoides são retirados dos peixes, sem contato com a água, misturados e somente depois adicionados à água (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007).

O procedimento de fertilização a seco possibilita a vantagem de ampliar o tempo para o manejo dos gametas, permitindo assim, a separação e a quantificação da desova nas porções a serem estocadas em distintas incubadoras, além de aumentar a taxa de fertilização. Após a mistura dos ovócitos ao sêmen, se procede a inclusão de água para ativação dos gametas, porém, a quantidade a ser adicionada precisa ser bem dimensionada. A inclusão de muita água causa a diluição do sêmen, e a diminuição da possibilidade de que encontrem a micrópila para a fertilização, da mesma forma que a quantidade insuficiente pode causar a obstrução da micrópila pelo muco do ovário ou pelo contato de outro óvulo (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983).

2.4 Parâmetros de qualidade dos gametas

No intuito de estabelecer métodos de produção de larvas com qualidade, uma série de parâmetros reprodutivos deve ser avaliada, buscando uma maior eficiência do plantel de reprodutores por meio do uso de seus gametas.

Com relação à qualidade do ovócito, parâmetros como, peso de desova, número de ovócitos por grama desovada (Figura 5), número de ovócitos por fêmea, indução da ovulação, tipo e tamanho do ovócito são parâmetros comuns observados em fêmeas de mesma espécie (GODINHO, 2007). A distribuição da frequência percentual dos diâmetros dos ovócitos como indicador do grau de desenvolvimento gonadal de peixes brasileiros foi descrita pela primeira vez por Fenerich-Verani, Narahara e Godinho (1984) com curimbatá *Prochilodus scrofa* (= *P. lineatus*). Esta mesma técnica foi utilizada para descrever o desenvolvimento gonadal de espécie do gênero *Brycon* (ROMAGOSA et al., 2001).



Figura 5 Avaliação do número de ovócitos por grama desovada em *P. lineatus*

Outra metodologia utilizada como indicador do grau de desenvolvimento gonadal para a seleção de fêmeas aptas à reprodução e da qualidade da desova é a análise da posição da vesícula germinal dos ovócitos. Ovócitos em final de maturação apresentam o núcleo situado na periferia da célula, contrariamente ao que ocorre em ovócitos imaturos ou em maturação, em que a posição do núcleo é central (BRZUSKA, 1979; MURGAS et al., 2011).

Na avaliação da desova, outros parâmetros devem ser avaliados, como índice de desova ($ID = \text{peso desova} \times 100 / \text{peso corporal}$), taxa de fertilização ($TF = \text{número de ovos viáveis} \times 100 / \text{número total de ovos}$), além da taxa de eclosão das larvas ($TE = \text{número de larvas eclodidas} \times 100 / \text{número total de ovos}$; Figura 6) e porcentagem de larvas normais ($LN = \text{número de larvas normais} \times 100 / \text{número total de larvas}$) (VIVEIROS et al., 2012).

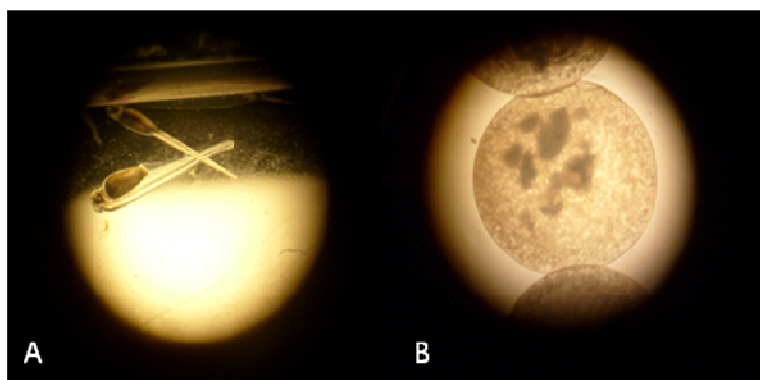


Figura 6 Larvas eclodidas (A) e ovos gorados (B) de *B. orbignyana*, observados em estereomicroscópio

A avaliação das características seminais é importante na rotina da reprodução artificial em qualquer espécie animal (FOGLI DA SILVEIRA; KAWAMOTO; RIGOLINO, 1988). A qualidade do sêmen pode ser avaliada em diferentes níveis de complexidade: espermátocrito, viabilidade espermática,

porcentagem de motilidade espermática, intensidade da motilidade espermática, ultraestrutura dos espermatozoides, composição química do plasma ou pela capacidade de fertilização que os espermatozoides possuem (RURANGWA et al., 2001).

Na maioria das espécies de peixes que recebem o tratamento hormonal, é observado um aumento significativo no volume seminal. Porém, o volume não tem um valor intrínseco biológico, e sim pela quantidade de células fecundantes que possa conter. O volume é muito variável entre as diversas espécies e até mesmo na mesma espécie, por ser influenciado pela estação do ano, clima, período de repouso sexual e método de coleta (MURGAS et al., 2011).

A motilidade espermática é o parâmetro mais utilizado para a avaliação da qualidade dos espermatozoides (ALAVI et al., 2008; COSSON et al., 2008). Esta é uma importante ferramenta para uma eficiente fertilização dos ovócitos. A simples estimativa da viabilidade microscópica (200 ou 400 x) do sêmen fresco é usada para uma avaliação inicial da qualidade espermática (KAVAMOTO; FOGLI DA SILVEIRA, 1986). O resultado é expresso em porcentagem de espermatozoides móveis, na escala de 0 a 100%, em relação ao total de espermatozoides analisados (MARIA et al., 2006; VIVEIROS et al., 2009). Além disso, técnicas mais modernas de análises de motilidade, e velocidades linear, curvilínea e de percurso médio, entre outras análises, têm sido realizadas por meio de um sistema computadorizado de análise do sêmen, conhecido em inglês como CASA (Computer-Assisted Semen Analysis; Figura 7). O sistema CASA realiza quantificação da qualidade seminal de forma mais objetiva e abrangente disponível atualmente (WILSON-LEEDY; INGERMANN, 2007). O CASA utiliza um software para coletar, detectar, identificar e quantificar atributos da motilidade na amostra de sêmen. As definições para aplicação do CASA são baseadas em características, como tamanho, forma e trajetória de natação do espermatozoide em cada espécie avaliada (YANG; TIERSCH, 2011).

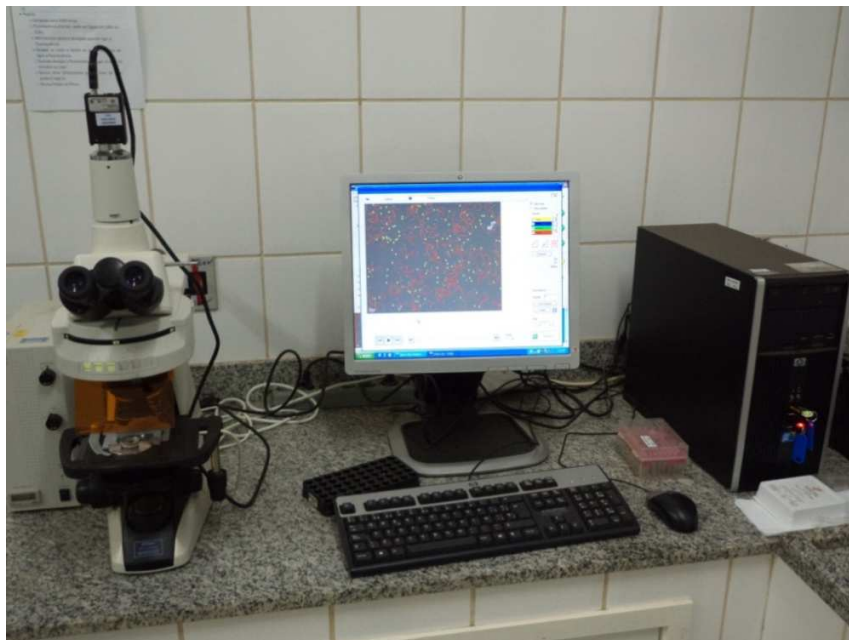


Figura 7 Sistema computadorizado de análise do sêmen (CASA)

Os fatores mais importantes na determinação da ativação espermática são: pressão osmótica, composição iônica e o pH, sendo que a mudança na pressão osmótica é o fator que mais influencia a ativação dos espermatozoides (BILLARD et al., 1995). Assim, análises de osmolalidade e pH do sêmen, ou do plasma seminal, são parâmetros necessários à avaliação da qualidade espermática.

O vigor espermático, que se caracteriza pela velocidade com que os espermatozoides se movimentam, é outro parâmetro essencial para avaliação dos espermatozoides de peixes (COSSON et al., 1999; VERMEIRSSSEN et al., 2003). Sua escala segue valores de 0 a 5, em que 0 significa espermatozoides sem nenhuma motilidade e 5 significa espermatozoides nadando rapidamente (VIVEIROS et al., 2011). Já o tempo de vida dos espermatozoides, apresenta

variação entre as espécies de peixes e coincide, geralmente, com o período de fertilização dos ovócitos, estando diretamente relacionado com o período de intensidade da motilidade (COSSON et al., 1999; STOSS, 1983). A maioria dos dados sobre a duração da motilidade dos espermatozoides estão dentro da variação típica para teleósteos de água doce, de aproximadamente 33 segundos em *B. orbignyana* para tão longo quanto aproximadamente 111 segundos em *P. lineatus* (VIVEIROS; GODINHO, 2009).

A concentração espermática (Figura 8) é um parâmetro que interfere sobre a fertilização dos peixes, avaliado por meio da contagem de espermatozoides em câmara hematimétrica de Neubauer (BILLARD et al., 1996; VIVEIROS et al., 2011), permitindo maximizar o uso do material inseminante e aumentar a taxa de fertilização. Os peixes produzem quantidade variável de gametas. Em algumas espécies, o macho produz 100 bilhões de espermatozoides/ano/kg do peso corporal ou mais de 1×10^9 espermatozoides/g de testículo/dia, o que é 10 vezes maior do que a produção relatada para mamíferos (BILLARD, 1990).

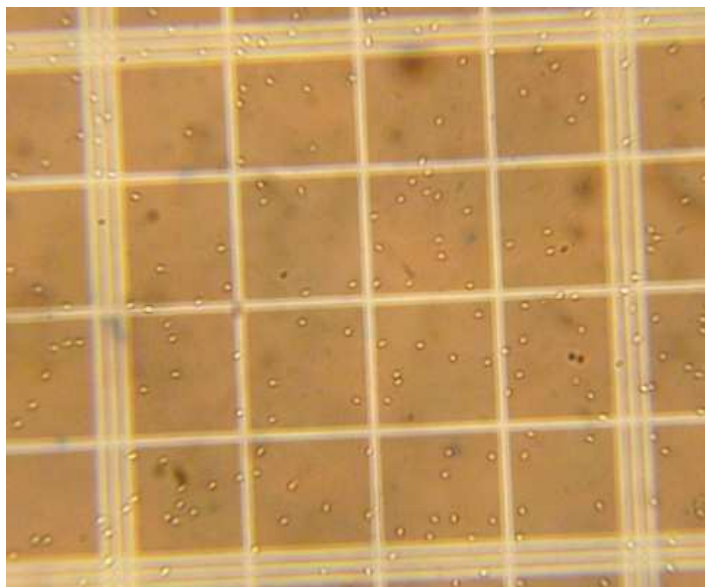


Figura 8 Análise da concentração espermática de *P. lineatus* em câmara de Neubauer, por meio do microscópio de luz (400 x)

2.5 Influência do meio (solução) sobre a qualidade seminal

Em geral, a motilidade espermática é induzida por pressão hiposmótica em peixes de água doce e por pressão hiperosmótica em peixes marinhos (ALAVI et al., 2007). Na maioria das espécies de peixes, os espermatozoides são imóveis nos testículos e no plasma seminal (MORISAWA; MORISAWA, 1990). A osmolalidade e composição do plasma seminal normalmente previnem a motilidade espermática nos ductos espermáticos de peixes (BILLARD, 1986). O plasma seminal de peixes é constituído, em grande parte, por compostos minerais (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}). Esses compostos (íons) estão envolvidos na regulação da osmolalidade (HE; KEERAN-JENKINS; WOODS, 2004). O fluido seminal não só imobiliza os espermatozoides, mas também os protege (COSSON et al., 1997). Por conseguinte, a motilidade é induzida após liberação

e contato dos espermatozoides com o meio aquoso durante a reprodução natural ou com o meio diluente durante a propagação artificial (COSSON, 2010).

Osmolalidade é definida como a concentração de solutos totais numa solução, com a propriedade de exercer pressão no interior da referida solução. Esta propriedade do soluto é conhecida como pressão osmótica, que está envolvida na regulação do fluxo de água por meio de uma membrana, fenômeno chamado de osmose. Assim, quando concentração de soluto (mOsm/kg de água) é mais baixa no meio onde se encontra imersa uma célula, do que no próprio citosol (hiposmótica), esta tende a aumentar seu volume, introduzindo água do meio ambiente; mas, quando a célula é imersa numa solução mais concentrada (hiperosmótica), sofre a redução do tamanho e saída de água da membrana (BOLSOVER et al., 2004). Além da osmolalidade, vários parâmetros como temperatura, pH, íons (incluindo Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) e taxa de diluição influenciam a motilidade espermática, em qualquer solução de ativação ou de imobilização (ALAVI; COSSON, 2005, 2006).

A ativação por meio aquoso é imediatamente seguida por uma resposta, com o espermatozoide nadando a toda velocidade, o que requer o alto consumo de energia pelos espermatozoides, e levando a um breve período móvel (COSSON et al., 1999). Para ativar ou suprimir a motilidade seminal, a modificação do ambiente celular (osmolalidade) por meio da utilização de açúcares (HORVÁTH; MISKOLCZI; URBANY, 2003) e de soluções salinas (YANG et al., 2006) tem sido bem sucedida para algumas espécies de peixes de água doce. Diversas soluções ativadoras e supressoras da motilidade seminal têm sido estudadas em espécies Characiformes. São exemplos de ativadores NaHCO_3 , NaCl , água do tanque e água destilada. Supressores ou diluidores são soluções aquosas em que crioprotetores e sêmen são diluídos antes do congelamento. Inúmeras soluções foram testadas como diluidor de sêmen de peixe; algumas foram salinas simples (NaCl 0,8 ou 0,9%) ou solução de açúcar

(glicose 5%), enquanto outras tinham uma fórmula mais complexa, como o BTS[®] (Minitub[®]), V2e e Cortland, em que sais e açúcares são combinados (VIVEIROS; GODINHO, 2009).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, são apresentadas informações sobre procedimentos que visam aprimorar a reprodução artificial de curimatá *P. lineatus* e piracanjuba *B. orbignyanus*, otimizando o uso de reprodutores e seus gametas, por meio da utilização do sêmen fresco e ovócitos de qualidade.

Embora diferentes meios hipotônicos provoquem o início da motilidade espermática e meios hipertônicos suprimam a motilidade em peixes de água doce, pesquisas sobre as concentrações dos meios (ativador e diluidor) tornam-se necessárias para aprimorar a reprodução artificial, maximizando a produção de alevinos. Por meio dessas pesquisas, métodos de sincronização reprodutiva e criopreservação do sêmen podem ser realizados com maior eficiência.

A interação entre sistema endócrino e ambiente é o principal gerador do sucesso reprodutivo de peixes. Como, em cativeiro, as espécies de piracema necessitam de indução hormonal para reproduzir, a escolha do hormônio torna-se um fator chave para a regulação do ciclo reprodutivo, culminando com desova e espermição de qualidade.

A obtenção de uma reprodução artificial de alta qualidade possibilita reduzir o estoque de reprodutores na piscicultura, por meio do maior aproveitamento dos gametas para fertilização, reduzindo a mão de obra, estrutura física, e com isso, reduzindo os custos investidos na produção.

REFERÊNCIAS

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: I., effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**, London, v. 29, n. 2, p. 101-110, Feb. 2005.

_____. Sperm motility in fishes: II., effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, London, v. 30, n. 1, p. 1-14, Jan. 2006.

ALAVI, S. M. H. et al. Morphology and fine structure of *Barbus barbuis* (Teleostei: Cyprinidae) spermatozoa. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 378-381, Aug. 2008.

_____. Semen of *Perca fluviatilis* L.: sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 68, n. 2, p. 276-283, July 2007.

ARIAS ACUÑA, J. J.; HERNÁNDEZ RANGEL, J. L. Efectos del extracto hipofisiario de carpa común y el análogo de la GnRH sobre la maduración final del oocito y el desove de la cachama negra (*Colossoma macropomum*). **Revista Científica FCV-Luz**, Maracaibo, v. 19, n. 5, p. 486-494, 2009.

BARBIERI, G. et al. Estratégias reprodutivas do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatá, *Prochilodus lineatus* no Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, com ênfase nos parâmetros matemáticos da dinâmica populacional: unidade de pesquisa e desenvolvimento de Pirassununga. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 169-174, 2004.

BILLARD, R. Artificial insemination in fish. In: LAMMING, P. (Ed.). **Marshall's physiology of reproduction**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990. v. 4, p. 870-888.

_____. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction and Nutritional Development**, Les Ulis, v. 2, n. 4, p. 877-920, 1986.

BILLARD, R. et al. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, n. 1/4, p. 95-112, Jan. 1995.

_____. Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg and larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1996. p. 25-52.

BOLSOVER, R. S. et al. **Cell biology**. 2nd ed. New York: J. Wiley, 2004. 552 p.

BROMAGE, N. et al. Egg quality determinants in finfish: the role of over ripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic Halibut *Hippoglossus hippoglossus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 25, n. 1, p. 13-21, Mar. 1994.

BRZUSKA, E. The in vivo method of estimating the stages of oocyte maturation in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Acta Hydrobiologica**, Krakow, v. 21, p. 423-433, 1979.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189 p.

CASTRO, F.; BEGOSI, A. Ecology of fishing on the Grande River (Brazil): technology and territorial rights. **Fisheries Research**, New York, v. 23, n. 3/4, p. 361-373, 1995.

CEJKO, B. I. et al. The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 28, n. 6, p. 873-877, Dec. 2012.

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.

COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, n. 1, p. 240-279, July 2010.

COSSON, J. et al. Movements of fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analysis. **Polish Archives of Hydrobiology**, Cincinnati, v. 44, n. 2, p. 103-113, 1997.

_____. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In: GAGNON, C. (Ed.). **The male gamete: from basic knowledge to clinical applications**. Montréal: Cache River, 1999. p. 161-186.

_____. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 460-486, Aug. 2008.

DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. A. Induced final maturation, ovulation, and spermiation. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**. Orlando: Academic, 1983. p. 352-403.

EENENNAAM, J. P. van et al. Artificial spawning and larval rearing of Klamath River green sturgeon. **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 130, n. 1, p. 159-165, Jan. 2001.

FENERICH-VERANI, N.; NARAHARA, M. Y.; GODINHO, H. M. The size composition of eggs of curimbatá *Prochilodus scrofa*, Steind., 1881, induced to spawn with human chorionic gonadotropin (hCG). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 42, p. 37-41, 1984.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo Irideus gibbons*, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 51-54, 1988.

FURUYA, W. M. Espécies nativas. In: MOREIRA, H. L. M. et al. (Org.). **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: ULBRA, 2001. p. 84-90.

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

GODOY, M. P. **Peixes e pesca do Rio Paraná**: área do futuro reservatório de Ilha Grande. Florianópolis: ELETROSUL, 1986. 148 p.

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

HE, S.; KEERAN-JENKINS, K.; WOODS, C. Activation of sperm motility in striped bass via a cAMP-independent pathway. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, n. 1/8, p. 1487-1498, May 2004.

HILL, J. E. et al. Preliminary observations of topical gill application of reproductive hormones for induced spawning of a tropical ornamental fish. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 67, n. 1, p. 7-9, Jan. 2005.

_____. Survey of ovaprim use as a spawning aid in ornamental fishes in the United States as administered through the University of Florida Tropical Aquaculture Laboratory. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 71, n. 3, p. 206-209, July 2009.

HIROSE, K.; ISHIDA, R.; SAKAI, K. Induced ovulation of ayu using hCG, with special reference to changes in several characteristics of eggs retained in the body cavity after ovulation. **Bull of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 43, p. 409-416, 1977.

HORVÁTH, A.; MISKOLCZI, E.; URBÁNY, B. Cryopreservation of common carp sperm. **Aquatic Living Resources**, Montrouge, v. 16, n. 5, p. 457-460, 2003.

HOUSSAY, B. A. Acción sexual de la hipófisis en los peces y reptiles. **Revista de la Sociedad Argentina de Biología**, Buenos Aires, v. 6, p. 686-688, 1930.

IHERING, R. von. A method for inducing fish to spawn. **Progressive Fish Culturist**, Bethesda, v. 34, p. 15-16, 1937.

INGRAM, B. et al. Induced spawning, larval development and rearing of two indigenous *Malaysian mahseer*, *Tor tambroides* and *T. douronensis*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 10, p. 1001-1014, July 2005.

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

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W. Physical, chemical and microscopic semen catfish, *Rhamdia hylarii* (Valenciennes, 1840) under field conditions. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 13, p. 95-100, 1986.

LAM, T. J. Environmental influences on gonadal activity in fish. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. Ž. (Ed.). **Fish physiology: reproduction**, part B. New York: Academic, 1983. p. 65-116.

MARIA, A. N. et al. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 3, n. 1, p. 55-60, Jan./Mar. 2006.

- MOHD-ZAINI, S.; SAADON, K.; DAN OMAR, A. B. Ovaprim: a new technology for spawning aquarium fish. **Progressive Fisheries Research Conference**, Kuala Lumpur, n. 4, p. 257-260, 1994.
- MORISAWA, M.; MORISAWA, S. Aquisition and initiation of sperm motility. In: GAGNON, C. (Ed.). **Controls of sperm motility: biological and clinical aspects**. Boca Raton: CRC. 1990. p. 137-152.
- MURGAS, L. D. S. et al. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 186-191, abr./jun. 2011.
- PAIVA, M. P. **Grandes represas do Brasil**. Brasília: Editerra, 1982. 292 p.
- PINILLOS, M. L. et al. Production, release and olfactory detection of sex steroids by the tench (*Tinca tinca* L.). **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 26, n. 2, p. 197-210, Mar. 2002.
- PROENÇA, C. E. M.; BITTENCOURT, P. R. L. **Manual de piscicultura tropical**. Brasília: IBAMA, 1994. 196 p.
- REAY, P. J. Reproductive tactics: a non-event in aquaculture? In: POTTS, G. W.; WOOTTON, R. J. (Ed.). **Fish reproduction: strategies and tactics**. London: Academic, 1989. p. 291-309.
- ROMAGOSA, E. et al. Seleção e caracterização de fêmeas de matrinxã, *Brycon cephalus*, induzidas a reprodução. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 139-147, 2001.
- RURANGWA, E. et al. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer assisted sperm analysis (CASA), viable staining standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, Los Angeles, v. 55, n. 3, p. 751-769, Feb. 2001.
- SARKAR, U. K. et al. Captive breeding of endangered fish *Chitala chitala* (Hamilton-Buchanan) for species conservation and sustainable utilization. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 15, p. 3579-3589, 2006.
- SATO, Y. **Reprodução de peixes da bacia do Rio São Francisco: indução e caracterização de padrões**. 1999. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

STACEY, N. E. Control of the timing of ovulation by exogenous and endogenous factors. In: POTTS, G. W.; WOOTON, R. J. Z. (Ed.). **Fish reproduction: strategies and tactics**. London: Academic, 1984. p. 207-222.

STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**. Orlando: Academic, 1983. p. 305-350.

STREIT JUNIOR, D. P. et al. Tendências de la utilización del extracto de hipófisis em la reproducción de peces: revisión. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Cascavel, v. 5, n. 2, p. 231-238, 2002.

TERRA DA GENTE. **Piracanjuba *B. orbignyanus***. Disponível em: <<http://www.vivaterra.org.br>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

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

VERMEIRSSSEN, E. L. M. et al. Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotrophin-releasing hormone agonist implant. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 230, n. 3, p. 547-567, May/June 2003.

VIVA TERRA. **Curimatá *P. lineatus***. Disponível em: <<http://www.terradagente.com.br>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 213, n. 1/4, p. 373-386, Oct. 2002.

_____. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 74, n. 4, p. 551-556, Sept. 2010.

_____. Simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 3, p. 293-300, 2009.

_____. Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). **Theriogenology**, Los Angeles, v. 78, n. 4, p. 803-810, Sept. 2012.

_____. Sperm cryopreservation of tiete *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 858-865, May 2011.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 35, n. 1, p. 137-150, Mar. 2009.

VIVEIROS, A. T. M.; LEAL, M. C.; SALLUM, W. B. **Reprodução das principais espécies de peixes nativos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2011. 94 p.

WILSON-LEEDY, J. G.; INGERMANN, R. L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 67, n. 3, p. 661-672, Feb. 2007.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, 1983. 225 p.

YANG, H. et al. Effect of osmotic immobilization on refrigerated storage and cryopreservation of sperm from a viviparous fish, the green swordtail *Xiphosphorus helleri*. **Cryobiology**, San Diego, v. 52, n. 2, p. 209-218, 2006.

YANG, H.; TIERSCH, T. R. Application of computer-assisted sperm analysis (CASA) to aquatic species. In: TIERSCH, T. R.; GREEN, C. C. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. 2nd ed. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2011. p. 240-254.

YANONG, R. P. E. et al. Atypical presentation of mycobacteriosis in a collection of frogfish (*Antennarius striatus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 34, n. 4, p. 400-407, Dec. 2003.

ZANIBONI FILHO, E.; BARBOSA, N. D. C. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 4, p. 655-659, nov. 1996.

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. Endocrinology and fish farming: aspects in reproduction, growth, and smoltification. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 7, p. 395-405, 1989.

ZOHAR, Y.; MYLONAS, C. C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 99-136, June 2001.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 **Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**

**Preparado de acordo com as normas e publicado na revista *Animal
Reproduction*, v. 10, n. 1, p. 62-70, 2013**

Abstract

GONÇALVES, A.C.S.; NASCIMENTO, A.F.; COSTA, A.C.; LEAL, M.C.; VIVEIROS, A.T.M. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).

Solutions to induce or suppress the initiation of sperm motility in fish have been used to improve reproductive success during artificial fertilization and preservation techniques. The aim of the present study was to evaluate the effects of three solutions (NaCl, glucose, and BTS™) - each prepared with 10 different osmolalities - on the initiation and suppression of fresh sperm motility in *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. Sperm was diluted in each of the 30 solutions and immediately observed under a light microscope to determine which solutions triggered or suppressed the initiation of sperm motility. When present, motility rate (% motile sperm) was determined at 0, 30, and 120 s post-activation and the motility quality score ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming sperm) was determined at 0 and 30 s post-activation. Osmolality, but not solution composition, significantly affected both motility rate and quality score. Solutions at osmolalities up to 270 mOsm/kg in *P. lineatus* and up to 180 mOsm/kg in *B. orbignyanus* induced motility in at least 60% of sperm, with a minimum quality score of 3.0, and were therefore classified as activating agents. The greatest motility at 0, 30, and 120 s post-activation was observed with solutions ranging from 135 to 225 mOsm/kg for *P. lineatus* and at 135 mOsm/kg for *B. orbignyanus*. On the other hand, solutions ranging from 360 to 450 mOsm/kg in *P. lineatus* and 270 to 450 mOsm/kg in *B. orbignyanus* suppressed motility in at least 95% of sperm and were classified as immobilizing media. The osmolality of the surrounding medium is the key

factor in the initiation or suppression of sperm motility in *P. lineatus* and *B. orbignyana*.

Keywords: Characiformes, extender, semen, sperm activation.

Resumo

GONÇALVES, A.C.S.; NASCIMENTO, A.F.; COSTA, A.C.; LEAL, M.C.; VIVEIROS, A.T.M. Iniciação e supressão da motilidade espermática é dependente da osmolalidade em duas espécies de peixes Sul-Americanos: curimatá (*Prochilodus lineatus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).

Soluções para induzir ou suprimir a iniciação da motilidade espermática em peixes têm sido utilizadas para aprimorar o sucesso reprodutivo durante a fertilização artificial e técnicas de preservação. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de três soluções (NaCl, glicose e BTS[®]) - cada uma preparada com 10 osmolalidades diferentes - sobre a iniciação e supressão da motilidade do sêmen fresco em *Prochilodus lineatus* e *Brycon orbignyanus*. O sêmen foi diluído em cada uma das 30 soluções e imediatamente observado sob um microscópio de luz para determinar quais as soluções desencadearam ou suprimiram a iniciação da motilidade espermática. Quando presente, a taxa de motilidade (% de espermatozoides móveis) foi determinada a 0, 30 e 120 segundos pós-ativação e o vigor espermático, variando de 0 (nenhum movimento) a 5 (espermatozoides nadando rapidamente), foi determinado a 0 e 30 segundos pós-ativação. Osmolalidade, mas não a composição da solução, afetou significativamente tanto a taxa de motilidade quanto vigor espermático. Soluções em osmolalidades até 270 mOsm/kg em *P. lineatus* e até 180 mOsm/kg em *B. orbignyanus* induziram motilidade em pelo menos 60% dos espermatozoides, com um vigor espermático mínimo de 3,0, e foram portanto classificadas como agentes ativadores. A maior motilidade a 0, 30 e 120 segundos pós-ativação foi observada com soluções que vão de 135 a 225 mOsm/kg para *P. lineatus* e a 135 mOsm/kg para *B. orbignyanus*. Por outro lado, soluções variando de 360 a 450 mOsm/kg em *P. lineatus* e 270 a 450 mOsm/kg em *B. orbignyanus* suprimiram a motilidade em pelo menos 95% dos espermatozoides e foram classificadas como meios imobilizadores. A

osmolalidade do meio circundante é o fator chave na iniciação ou supressão da motilidade espermática em *P. lineatus* e *B. orbignyana*.

Palavras-chave: Characiformes, diluidor, sêmen, ativação espermática.

Introduction

The streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and the piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) are fish from the order Characiformes and are native to South America. During the rainy season (October to February), these species migrate to find clean water and spawn. The detritivorous *P. lineatus* belongs to the Prochilodontidae family and its sediment processing activities are important to the structuring of community dynamics in tropical streams (Flecker, 1996). *P. lineatus* larvae serve as prey for carnivorous fish species and adult fish are used for human consumption, especially in northeastern Brazil (Viveiros *et al.*, 2009). As artificial reproduction methods are well established and prolificacy is high, *P. lineatus* has been used as a model species for research in a number of studies addressing nutrition, health, genetic diversity, and reproduction (Viveiros *et al.*, 2010). *B. orbignyanus* belongs to the Characidae family and is an omnivorous species that feeds on other fish (in early life stages), fruits, and seeds. Overfishing, the destruction of riparian vegetation, pollution, and hydroelectric dams have led to a decline in populations of *B. orbignyanus*, which is currently classified as an endangered species (Rosa and Lima, 2008). *B. orbignyanus* exhibits fast growth in captivity and has an excellent meat quality, indicating that it can be produced on a commercial scale, which may prevent its extinction (Maria *et al.*, 2006a).

Like the majority of teleosts (Morisawa and Suzuki, 1980), the sperm of *P. lineatus* and *B. orbignyanus* are immotile in the male genital tract and motility is triggered when the sperm is released into the water (Maria *et al.*, 2006a, b; Viveiros *et al.*, 2009). Osmolality, pH, temperature, and ion concentration affect sperm motility (Morisawa and Suzuki, 1980; Alavi and Cosson, 2006). Studies addressing the effects of these factors on the induction of sperm motility are necessary for the establishment of standard activating agents

(media that trigger motility) and immobilizing media, which prevent the initiation of sperm motility (also called extenders), for improving artificial fertilization and preservation techniques (Alavi *et al.*, 2009b). In 2006, Alavi and Cosson published a review paper addressing the effects of osmolality on fish sperm motility, focusing on species of three orders (Salmoniformes, Cypriniformes, and Acipenseriformes). At that time, no similar study on Characiformes species had been carried out and only four studies had since been conducted to evaluate the effects of osmolality on the induction and suppression of fresh sperm motility in Characiformes. In NaCl solution, sperm motility was reported to be induced at 49 to 147 mOsm/kg and suppressed at 196 to 392 mOsm/kg in *Brycon orthotaeniae* (Melo and Godinho, 2006), induced at 0 to 274 mOsm/kg and suppressed at 410 to 547 mOsm/kg in *Brycon insignis* (Shimoda *et al.*, 2007), and induced at 0 to 270 mOsm/kg and suppressed at 450 mOsm/kg in *Colossoma macropomum* (Carneiro *et al.*, 2012). In a glucose solution, sperm motility was reported to be induced at 62 to 310 mOsm/kg and suppressed at 410 to 620 mOsm/kg in *Prochilodus magdalenae* (Martínez *et al.*, 2011). In NaHCO₃ solution, sperm motility was reported to be induced at 0 to 270 mOsm/kg and suppressed at 450 mOsm/kg in *C. macropomum* (Carneiro *et al.*, 2012). In another study involving Characiformes, sperm from *Brycon opalinus* was diluted in NaCl and glucose solutions from 245 to 365 mOsm/kg and motility was completely suppressed only at osmolalities greater than 325 mOsm/kg, regardless of the extender composition (Orfão *et al.*, 2011).

The use of 0.29% NaCl as an activating agent and 0.9% NaCl, 5% glucose, and 5% BTS™ (Beltsville Thawing Solution) as an immobilizing medium for sperm from *P. lineatus* and *B. orbignyanus* has been tested at these standard concentrations by our research group (Maria *et al.*, 2006a, b; Viveiros *et al.*, 2009, 2010; Orfão *et al.*, 2010). Solution composition and the osmolality range in which maximum sperm motility is either triggered or suppressed,

however, require further investigation. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of three solutions (NaCl, glucose, and BTS™) prepared at osmolalities ranging from 45 to 450 mOsm/kg on the initiation and suppression of fresh sperm motility in *P. lineatus* and *B. orbignyanus*.

Materials and Methods

Fish handling and sperm collection

All fish were handled in compliance with the guidelines for animal experimentation described by Van Zutphen *et al.* (2001). During the spawning season (December to January), *P. lineatus* males were selected from earthen ponds at the Hydrobiology and Fish Culture Station of Furnas in the city of São José da Barra (20°43'07'' S; 46°18'50'' W) and the Fish Culture Station of the Minas Gerais Power Company (CEMIG) in the city of Itutinga (21°17'36'' S; 44°37'02'' W) - both located in the state of Minas Gerais, Brazil. *B. orbignyanus* males were selected only from the Furnas Fish Culture Station. Males with detectable running sperm under soft abdominal pressure received intramuscular doses of carp pituitary extract (cPE; Argent Chemical Laboratory, Redmond, Washington, USA) using the routine method at each fish culture station. At Furnas, all males received a single dose of 3 mg cPE/kg BW and were stripped after 8.5 h (*P. lineatus*; n = 7) and 5 h (*B. orbignyanus*; n = 7) at 25-26°C. At CEMIG, *P. lineatus* males (n = 7) received two doses of cPE (0.25 and 0.75 mg/kg BW) with a 12-h interval between injections and were stripped after 7.5 h at 27-28°C. The urogenital papilla was carefully dried and approximately 5 ml of sperm were hand stripped directly into graduated glass tubes. Sperm collection was carried out at room temperature (22-24°C). Immediately after collection, the tubes containing sperm were maintained in a

cooler (9-11°C) containing dry ice foam (Polar Technics CRI Ltd., Brazil). Contamination of sperm with water, blood, feces, or urine was carefully avoided.

Determination of fresh sperm features

Immediately after collection, 5 µl of each sperm sample were placed on a glass slide and observed using a light microscope (Model L1000, Bioval, Jiangbei, China) at 400X magnification. Any sperm motility observed was considered premature induction caused by urine or water contamination. All sperm samples were immotile and the motility rate (expressed as percentage of motile sperm) was subjectively estimated following the addition of 50 µl of an activating agent composed of 0.29% NaCl (~98 mOsm/kg) using the method employed in our laboratory for Characiformes species (Viveiros *et al.*, 2009, 2010; Orfão *et al.*, 2010). As the sticking of sperm to glass slides has not been observed in Characiformes species, the addition of BSA or any other protein in the activating agent is not necessary (Orfão *et al.*, 2011). The motility quality score was assigned using an arbitrary grading system ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming sperm), based on Viveiros *et al.* (2011). Sperm concentration was determined using a hemacytometer/Neubauer chamber (Boeco, Hamburg, Germany). The osmolality of the seminal plasma was measured (Semi-Micro Osmometer K-7400, Knauer, Berlin, Germany) after centrifugation of the sperm at 2000 x g for 30 min (MiniStar, Shanghai, China). Sperm characteristics of all samples were evaluated at room temperature (~25°C) by the same well-trained technician.

Solution composition and osmolality

Thirty solutions (NaCl, glucose or BTS™ – each at 10 different osmolalities ranging from 45 to 450 mOsm/kg) were prepared in 100 ml amber glass bottles, stored in a refrigerator at 6-8°C and used within 48 h. BTS™ (Beltsville Thawing Solution, Minitube™, Tiefenbach/Landshut, Germany) is a boar sperm extender composed of 79.9% glucose, 12.7% sodium citrate, 2.7% EDTA, 2.7% NaHCO₃, 1.5% KCl and 0.5% gentamycin sulfate.

Sperm from each male (14 specimens of *P. lineatus* and 7 specimens of *B. orbignyana*) was diluted at 1:10 (sperm:total volume) in each of the 30 solutions directly on a glass slide and immediately observed under a light microscope to determine which solutions would trigger or suppress the initiation of sperm motility. Motility rate, when present, was subjectively determined at 0, 30, and 120 s post-activation and expressed as the percentage of motile sperm. The motility quality score was determined on the same glass slide and evaluated at 0 and 30 s post-activation. Solutions triggering sperm motility in at least 60% of sperm with a quality score of 3 or higher were classified as activating agents, and those for which the initiation of sperm motility was suppressed in at least 95% of sperm were classified as immobilizing media.

Statistical analyses

Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were carried out using the computational program of R Development Core Team (2010). Data that did not exhibit normal distribution were transformed using the bootstrap method (Efron and Tibshirani, 1993) with 2000 samplings for the analysis of multiple comparisons. Statistical significance was

tested using analysis of variance (ANOVA) followed by the Scott-Knott test. The level of significance for all statistical tests was set at 5% ($P < 0.05$).

Results

Fresh sperm features

Table 1 displays the observed values for body weight, characteristics of fresh sperm and osmolality of the seminal plasma evaluated in the present study. For *P. lineatus*, mean sperm motility was similar between fish culture stations (89% motile sperm and a quality score of 4.1-4.4). However, males from the Furnas station had lower sperm concentration (19.2×10^9 sperm/ml) and greater seminal plasma osmolality (337 mOsm/kg) in comparison to those from the CEMIG station (26.8×10^9 sperm/ml and 286 mOsm/kg). *B. orbignyana* exhibited 89% motile sperm, a quality score of 4.0, concentration of 6.0×10^9 sperm/ml and seminal plasma osmolality of 301 mOsm/kg.

Table 1 Body weight and some fresh sperm features in *Prochilodus lineatus* originated from two different fish culture stations (Furnas and CEMIG) and *Brycon orbignyanus* from the Furnas station after carp pituitary treatment (cPE).

Features	<i>P. lineatus</i>				<i>B. orbignyanus</i>	
	Furnas		CEMIG		Furnas	
	(3.0 mg cPE/kg)		(0.25 + 0.75 mg cPE/kg)		(3.0 mg cPE/kg)	
	Mean ± SD	Min-Max	Mean ± SD	Min-Max	Mean ± SD	Min-Max
Body weight (kg)	1.4 ± 0.4 ^a	1.0 - 2.0	1.1 ± 0.3 ^a	0.7 - 1.4	1.0 ± 0.8	0.6 - 2.3
Motility rate (% motile sperm)	89 ± 7 ^a	75 - 95	89 ± 4 ^a	85 - 95	89 ± 5	85 - 95
Motility quality score ¹ (0 - 5)	4.1 ± 0.4 ^a	4.0 - 5.0	4.4 ± 0.5 ^a	4.0 - 5.0	4.0 ± 0.5	4.0 - 5.0
Concentration (sperm x 10 ⁹ /mL)	19.2 ± 2.9 ^b	15.1 - 23.9	26.8 ± 2.7 ^a	23.1 - 28.9	6.0 ± 2.4	2.7 - 8.9
Seminal plasma osmolality (mOsm/kg)	337 ± 8 ^a	328 - 346	286 ± 7 ^b	276 - 291	301 ± 11	289 - 313

¹ The motility quality score was assigned using an arbitrary grading system ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming sperm).

^{a,b} Means within the same row for *P. lineatus* followed by different superscript letters are significantly different (P < 0.05; Scott-Knott test).

Solution composition and osmolality

Osmolality, but not solution composition, significantly affected sperm motility (both rate and quality score) in both species. In *P. lineatus*, solutions with osmolalities up to 270 mOsm/kg induced motility ranging from 65 to 95% motile sperm and a quality score of 3.9 to 4.9, and were therefore classified as activating agents. The only exception was BTS™ at 270 mOsm/kg, in which motility was triggered in only 54% of sperm in males from the CEMIG station; however this value did not differ significantly from the motility triggered in NaCl or glucose solutions at the same osmolality. Greater ($P < 0.05$) motility rates were observed when sperm was diluted in solutions within 135 and 225 mOsm/kg among individuals from both the Furnas (87-94% motile sperm; quality score of 4.3-4.7) and CEMIG (77-95% motile sperm; quality score of 4.1-4.9) stations, regardless of the solution composition. At 270 and 315 mOsm/kg, considerable variation in motility rate was observed among individuals, as evidenced by the large standard deviations in these samples. Solutions at 360 mOsm/kg or above suppressed motility in at least 95% of sperm and were therefore classified as immobilizing media for *P. lineatus* (Table 2).

In *B. orbignyana*, solutions at osmolalities up to 180 mOsm/kg induced motility ranging from 71 to 91% motile sperm and a quality score of 4.0 to 5.0, and were therefore classified as activating agents. The greatest motility (89-91% motile sperm; quality score of 4.7-5.0) was found when sperm was diluted at 135 mOsm/kg, regardless of the solution composition. At 225 mOsm/kg, considerable variation in motility rate was observed among individuals, as evidenced by the large standard deviations in these samples. Solutions at 270 mOsm/kg or above suppressed motility in at least 95% of sperm and were therefore classified as immobilizing media for *B. orbignyana* (Table 2).

Table 2 Motility rate (expressed as percentage of motile sperm) in sperm from *Prochilodus lineatus* (n = 14 males) and *Brycon orbignyanus* (n = 7 males) diluted in three different solution compositions (NaCl, glucose and BTS™) at osmolalities ranging from 45 to 450 mOsm/kg and observed immediately under a light microscope. *P. lineatus* males originated from two different fish culture stations (Furnas and CEMIG) and *B. orbignyanus* males originated only from the Furnas station.

Osmolality	<i>P. lineatus</i> (Furnas)				<i>P. lineatus</i> (CEMIG)				<i>B. orbignyanus</i> (Furnas)			
	NaCl	Glucose	BTS™	Mean	NaCl	Glucose	BTS™	Mean	NaCl	Glucose	BTS™	Mean
45	79 ± 13	83 ± 12	80 ± 9	80 ± 11	74 ± 7	80 ± 8	73 ± 10	76 ± 9	71 ± 6	73 ± 6	71 ± 6	72 ± 5
90	86 ± 9	89 ± 10	86 ± 9	87 ± 9	78 ± 3	81 ± 5	77 ± 6	79 ± 5	78 ± 4	82 ± 6	79 ± 4	80 ± 5
135	88 ± 5	91 ± 6	91 ± 6	90 ± 6	82 ± 4	90 ± 5	82 ± 4	85 ± 6	89 ± 7	91 ± 4	89 ± 6	90 ± 5
180	92 ± 4	94 ± 6	94 ± 6	93 ± 5	89 ± 5	95 ± 3	89 ± 5	91 ± 5	79 ± 6	81 ± 7	80 ± 5	80 ± 6
225	89 ± 6	91 ± 6	87 ± 8	89 ± 6	81 ± 9	90 ± 4	77 ± 10	83 ± 9	46 ± 16	54 ± 16	51 ± 11	50 ± 14
270	79 ± 10	80 ± 14	79 ± 6	79 ± 10	65 ± 16	76 ± 11	54 ± 20	65 ± 18	1 ± 1	2 ± 2	4 ± 4	3 ± 3
315	56 ± 16	44 ± 21	31 ± 17	43 ± 20	22 ± 8	31 ± 12	14 ± 10	22 ± 12	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
360	2 ± 4	2 ± 4	0 ± 1	2 ± 3	4 ± 6	1 ± 2	0 ± 1	2 ± 4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
405	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
450	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Within a given osmolality and fish species, solution composition did not affect sperm motility ($P > 0.05$). Beltsville Thawing Solution, Minitub™ (79.9% glucose, 12.7% sodium citrate, 2.7% EDTA, 2.7% NaHCO₃, 1.5% KCl and 0.5% gentamycin sulfate).

To track the decrease in sperm motility after activation, the motility rate was evaluated for 120 s and the motility quality score was evaluated for 30 s in each of the solutions classified as activating agents (45 to 270 mOsm/kg for *P. lineatus*; 45 to 180 mOsm/kg for *B. orbignyana*). As data on *P. lineatus* males from both the Furnas and CEMIG stations and the three solution compositions within a given osmolality were similar, the data were pooled per fish species and osmolality. In *P. lineatus*, motility significantly decreased from a mean of 72-92% to 8-51% motile sperm during the 120 s analysis and the quality score decreased from 4.1-4.7 to 2.5-3.7 during the 30 s analysis. In general, motility (rate and quality score) was greater when sperm was diluted in solutions at 135, 180, and 225 mOsm/kg in comparison to solutions at 45, 90, and 270 mOsm/kg, regardless of the observation time (Fig. 1).

In *B. orbignyana*, motility significantly decreased from a mean of 72-90% to 1-32% motile sperm during the 120 s analysis and the quality score decreased from 4.0-4.9 to 2.3-3.3 during the 30 s analysis. In general, motility (rate and quality score) was greater when sperm was diluted in solutions at 135 mOsm/kg in comparison to solutions at 45, 90, and 180 mOsm/kg, regardless of the observation time (Fig. 2).

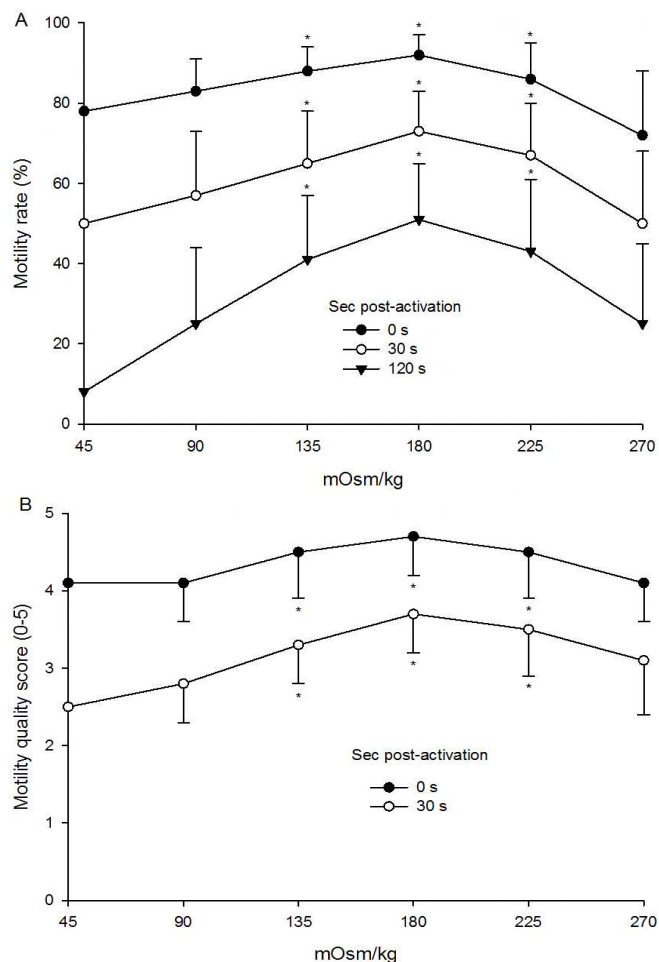


Figure 1 Motility rate (A) and quality score (B) for sperm from *Prochilodus lineatus* ($n = 14$) diluted in activating agents at osmolalities ranging from 45 to 270 mOsm/kg. Motility rate was determined at 0, 30, and 120 s post-activation, while quality score was determined at 0 and 30 s post-activation. Motility quality score was assigned using an arbitrary grading system ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming sperm). Sperm was diluted in three different solution compositions (NaCl, glucose, and BTSTM). Because there was no effect of composition on motility rate or quality score, data were pooled. *Means followed by an asterisk on each line were significantly higher than the others ($P < 0.05$; Scott-Knott test).

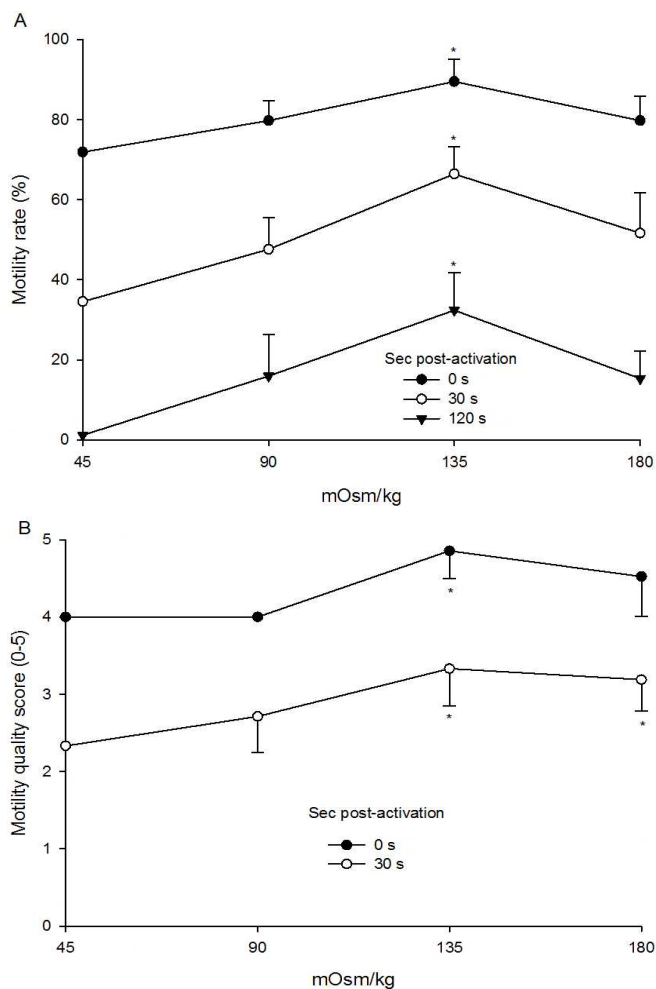


Figure 2 Motility rate (A) and quality score (B) for sperm from *Brycon orbignyanus* ($n = 7$) diluted in activating agents at osmolalities ranging from 45 to 180 mOsm/kg. Motility rate was determined at 0, 30, and 120 s post-activation, while quality score was determined at 0 and 30 s post-activation. Motility quality score was assigned using an arbitrary grading system ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming sperm). Sperm was diluted in three different solution compositions (NaCl, glucose, and BTSTM). Because there was no effect of composition on motility rate or quality score, data were pooled. * Means followed by an asterisk on each line were significantly higher than the others ($P < 0.05$; Scott-Knott test).

Discussion

The present study evaluated the effects of solutions with different compositions and osmolalities on fresh sperm motility and other features in *P. lineatus* and *B. orbignyanus*. The initial sperm quality for the specimens of *P. lineatus* and *B. orbignyanus* analyzed in this study were all within the range previously reported for both species following carp pituitary treatment (Viveiros and Godinho, 2009; Godinho and Viveiros, 2011). Improved knowledge of sperm quality is necessary for the evaluation of sperm quality in commercial hatcheries prior to artificial reproduction as well as in experiments carried out under laboratory conditions (Viveiros and Godinho, 2009; Orfão *et al.*, 2011).

The composition of the solution exerted no effect on the initiation or suppression of sperm motility in the *P. lineatus* and *B. orbignyanus* specimens. The media tested herein were a simple ionic solution (NaCl), a simple sugar solution (glucose), and a more complex solution containing both ions and sugar (BTS™). Likewise, solution composition was not found to affect the initiation or suppression of sperm motility in a previous study carried out by our research group using the same fish species (Nascimento *et al.*, 2012) or in other studies with Characiformes species such as *B. opalinus* (Orfão *et al.*, 2011) and *C. macropomum* (Carneiro *et al.*, 2012), and species from other orders, such as *Barbus barbatus* (Alavi *et al.*, 2009a), *Vimba vimba* (Alavi *et al.*, 2010), and *Esox lucius* (Alavi *et al.*, 2009b; Table 3).

Table 3 Reported seminal plasma osmolality and solutions considered as sperm activating agents and immobilizing media for some fish species.

Order (Family)	Species	Seminal plasma (mOsm/kg)	Solution composition	Activating agent ¹ (mOsm/kg)	Immobilizing medium ² (mOsm/kg)	Reference
Characiformes	<i>B. insignis</i>	--	NaCl	0 - 274	410 - 547	Shimoda <i>et al.</i> , 2007
(Characidae)	<i>B. opalinus</i>	297 - 340	NaCl	245	325 - 365	Orfão <i>et al.</i> , 2011
		297 - 340	Glucose	245	325 - 365	Orfão <i>et al.</i> , 2011
	<i>B. orbignyanus</i>	289 - 313	NaCl	45 - 180	270 - 450	Present study
		289 - 313	Glucose	45 - 180	270 - 450	Present study
		289 - 313	BTS™*	45 - 180	270 - 450	Present study
		300	Glucose	--	315 - 360	Nascimento <i>et al.</i> , 2012
		300	BTS™*	--	360	Nascimento <i>et al.</i> , 2012
	<i>B. orthotaeniae</i>	--	NaCl	~49 - ~147	~196 - ~392	Melo and Godinho, 2006
	<i>C. macropomum</i>	--	NaCl	0 - 270	450	Carneiro <i>et al.</i> , 2012
		--	NaHCO ₃	0 - 270	450	Carneiro <i>et al.</i> , 2012
Characiformes	<i>P. lineatus</i>	276 - 346	NaCl	45 - 270	360 - 450	Present study
(Prochilodontidae)		276 - 346	Glucose	45 - 270	360 - 450	Present study
		276 - 346	BTS™*	45 - 270	360 - 450	Present study
		306	Glucose	--	315 - 360	Nascimento <i>et al.</i> , 2012
		306	BTS™*	--	315 - 360	Nascimento <i>et al.</i> , 2012
	<i>P. magdalenae</i>	250 - 300	Glucose	62 - 310 ^C	410 - 620 ^C	Martínez <i>et al.</i> , 2011

“Table 3, continuation”

Order (Family)	Species	Seminal plasma (mOsm/kg)	Solution composition	Activating agent ¹ (mOsm/kg)	Immobilizing medium ² (mOsm/kg)	Reference
Cypriniformes (Cyprinidae)	<i>B. barbus</i>	249 - 294	NaCl	3 - 230 ^V	350 ^V	Alavi <i>et al.</i> , 2009b
		249 - 294	KCl	3 - 215 ^V	345 ^V	Alavi <i>et al.</i> , 2009b
		249 - 294	Sucrose	4 - 210 ^V	330 ^V	Alavi <i>et al.</i> , 2009b
	<i>V. vimba</i>	236 - 318	NaCl	30 - 240 ^V	285 ^V	Alavi <i>et al.</i> , 2010
		236 - 318	KCl	50 - 240 ^V	290 ^V	Alavi <i>et al.</i> , 2010
		236 - 318	Sucrose	30 - 210 ^V	300 ^V	Alavi <i>et al.</i> , 2010
Esociformes (Esocidae)	<i>E. lucius</i>	228 - 350	NaCl	0 - 300 ^V	375 ^V	Alavi <i>et al.</i> , 2009a
		228 - 350	Sucrose	0 - 235 ^V	375 ^V	Alavi <i>et al.</i> , 2009a
		228 - 350	Mannitol	0 - 235 ^V	400 ^V	Alavi <i>et al.</i> , 2009a
Perciformes (Percidae)	<i>P. fluviatilis</i>	298	Glucose	90 - 260 ^V	--	Boryshpolets <i>et al.</i> , 2009

¹ Solutions were classified as activating agents when motility was triggered in at least 60% of sperm. ²Solutions were classified as immobilizing media when motility was suppressed in at least 95% of sperm. *Beltsville Thawing Solution, Minitub™ (79.9% glucose, 12.7% sodium citrate, 2.7% EDTA, 2.7% NaHCO₃, 1.5% KCl and 0.5% gentamycin sulfate). Motility was always evaluated subjectively, except otherwise stated (^C computer-assisted sperm analysis, ^V video-recorded frames).

In the present study, all solutions at osmolalities within the range of 45 to 270 mOsm/kg and 45 to 180 mOsm/kg for *P. lineatus* and *B. orbignyanus*, respectively, induced motility in at least 60% of sperm and were therefore classified as activating agents. These activating agents were all hyposmotic in comparison to the seminal plasma of the males used in this study (276 to 346 mOsm/kg in *P. lineatus* and 289 to 313 mOsm/kg in *B. orbignyanus*). The results demonstrated that motility is triggered by hyposmotic solutions in both *P. lineatus* and *B. orbignyanus*, regardless of the solution composition. A number of studies have reported the triggering of fresh sperm motility in Characiformes species by solutions at osmolalities up to 270-310 mOsm/kg in species of the Prochilodontidae family and up to 147-274 mOsm/kg in species of the Characidae family (Table 3). In similar studies with fish species of other orders, sperm motility has been triggered in solutions at osmolalities up to 210-240 mOsm/kg in Cypriniformes, up to 235-300 mOsm/kg in Esociformes, and up to 260 mOsm/kg in Perciformes (Table 3). Rapid, acute changes in environmental osmotic pressure may be differentially involved in the activation mechanisms of fish sperm motility. Under natural spawning conditions, the rapid change in the osmolality of the surrounding medium is one of the triggers for the activation fish sperm motility (Bondarenko *et al.*, 2013).

To track the decrease in motility following activation, the motility rate was evaluated for 120 s and the motility quality score was evaluated for 30 s. In *P. lineatus*, only samples diluted in solutions within the range of 135 and 225 mOsm/kg exhibited greater than 40% motile sperm after 120 s and had a motility quality score above 3.0 after 30 s. In *B. orbignyanus*, only samples diluted in solutions at 135 mOsm/kg exhibited greater than 30% motile sperm after 120 s and had a motility quality score above 3.0 after 30 s. In both species, motility decreased faster at the lowest osmolality tested (45 mOsm/kg). Similarly, motility was reported to decrease faster when activated in solutions

within the range of 0 and 100 mOsm/kg in comparison to the range of 140 to 270 mOsm/kg in *C. macropomum* (Carneiro *et al.*, 2012), and when activated in distilled water in comparison to solutions within the range of 200 to 230 mOsm/kg in *E. lucius* (Alavi *et al.*, 2009b). Moreover, the exposure of sperm to distilled water led to different types of flagellum damage following sperm activation in *E. lucius*, such as cytoplasmic blebs along the length of the flagellum and a curling structure at the tip of the flagellum (Alavi *et al.*, 2009b). It has also been reported that the ATP content at the end of motility was very low following carp sperm activation at lower osmolalities in comparison to higher osmolalities (Billard *et al.*, 1995). It is possible that the *P. lineatus* and *B. orbignyanus* sperm activated in solutions with lower osmolalities were affected by some kind of flagellum damage induced by a large water influx, similar to that reported for *E. lucius*, and/or a lack of ATP content to promote flagellar movement for longer periods.

In the present study, motility was suppressed in at least 95% of sperm when the osmolality of the surrounding medium ranged from 360 to 450 mOsm/kg and 270 to 450 mOsm/kg for *P. lineatus* and *B. orbignyanus*, respectively. Solutions within these osmolality ranges can therefore be used as immobilizing media (extenders) for the conservation of sperm from these species. A number of studies found that fresh sperm motility was suppressed in solutions at or above 315 mOsm/kg in species of the Prochilodontidae family and at or above ~196 mOsm/kg in species of the Characidae family (Table 3). In similar studies with fish species of other orders, sperm motility was suppressed in solutions at or above 285 mOsm/kg in Cypriniformes and at or above 375 mOsm/kg in Esociformes (Table 3).

In conclusion, the initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in *P. lineatus* and *B. orbignyanus*. To trigger motility in the highest number of sperm, activating agents should be within the range of 135

to 225 mOsm/kg for *P. lineatus* and at 135 mOsm/kg for *B. orbignyana*. Moreover, immobilizing media should be at least 360 mOsm/kg for *P. lineatus* and at least 270 mOsm/kg for *B. orbignyana* to maintain the sperm during storage.

Acknowledgments

This study received funding from the Brazilian fostering agencies CNPq (grant PQ 302434/2011-9 to A.T.M.V.; grant 554950/2009-0 to A.C.S.G.; project 471393/2011-8), ANEEL P&D Furnas (017965), and FAPEMIG (PPM CVZ 00129-11; grant CVZ BPD 00216-11 to M.C.L.). The authors thank the undergraduate student M. Hamaue (UFLA), the biologists D.M. Ribeiro and M.B. Goulart (Furnas) and the staff members F.H. Siqueira, G.A. Azarias, and J.M. Silva (CEMIG, Itutinga Unit) for assistance during the experiments.

References

- Alavi SMH, Cosson J.** 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biol Int*, 30:1-14.
- Alavi SMH, Rodina M, Policar T, Linhart O.** 2009a. Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. *Comp Biochem Physiol A*, 153:430-437.
- Alavi SMH, Rodina M, Viveiros ATM, Cosson J, Gela D, Boryshpolets S, Linhart O.** 2009b. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). *Theriogenology*, 72:32-43.
- Alavi SMH, Kozak P, Hatf A, Hamackova J, Linhart O.** 2010. Relationships between reproductive characteristics in male *Vimba vimba* L. and the effects of osmolality on sperm motility. *Theriogenology*, 74:317-325.
- Billard R, Cosson J, Perchec G, Linhart O.** 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 124:95-112.
- Bondarenko O, Dzyuba B, Cosson J, Yamaner G, Prokopchuk G, Psenicka M, Linhart O.** 2013. Volume changes during the motility period of fish spermatozoa: interspecies differences. *Theriogenology*, 79:872-881.
- Boryshpolets S, Dzyuba B, Stejskal V, Linhart O.** 2009. Dynamics of ATP and movement in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) sperm in conditions of decreasing osmolality. *Theriogenology*, 72:851-859.
- Carneiro PCF, Azevedo HC, Santos JP, Maria AN.** 2012. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. *CryoLetters*, 33:385-393.
- Efron B, Tibshirani R.** 1993. *An Introduction to the Bootstrap*. New York, NY: Chapman & Hall. p. 436.

Flecker AS. 1996. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. *Ecology*, 77:1845-1854.

Godinho HP, Viveiros ATM. 2011. Current status of sperm cryopreservation of Brazilian Characiform fishes. In: Tiersch TR, Green CC (Ed.). *Cryopreservation in Aquatic Species*. 2nd ed. Baton Rouge, LA: The World Aquaculture Society. pp. 875-884.

Maria AN, Viveiros ATM, Freitas RTE, Oliveira AV. 2006a. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, 260:298-306.

Maria AN, Viveiros ATM, Orfão LH, Oliveira AV, Moraes GF. 2006b. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). *Anim Reprod*, 3:55-60.

Martínez G, García VA, Carrasco SP. 2011. Effect of glucose concentration on sperm motility activation in bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). *Rev MVZ Cordoba*, 16:2554-2563.

Melo FCSA, Godinho HP. 2006. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Anim Reprod*, 3:380-385.

Morisawa M, Suzuki K. 1980. Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*, 210:114-115.

Nascimento AF, Gonçalves ACS, Reis Neto RV, Leal MC, Viveiros ATM. 2012. Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*). *Anim Reprod*, 9:103-110.

Orfão LH, Maria AN, Nascimento AF, Isaú ZA, Viveiros ATM. 2010. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus*

(Characiformes) improved after dilution and cold storage. *Aquac Res*, 41:679-687.

Orfão LH, Nascimento AF, Corrêa FM, Cosson J, Viveiros ATM. 2011. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). *Aquaculture*, 311:241-247.

R Development Core Team. 2010. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available on: <http://www.R-project.org>. Accessed on: Jan. 18. 2012.

Rosa RS, Lima FT. 2008. Os peixes ameaçados de extinção. In: Machado, ABM, Drummond, GM, Paglia, AP (Ed.). *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas. p. 9-285.

Shimoda E, Andrade DR, Vidal Jr MV, Yasui GS, Silva JFS, Godinho HP, Souza G. 2007. Efeito da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. *Rev Ceres*, 54:430-433.

Van Zutphen LF, Baumans V, Beynen AC. 2001. *Principles of Laboratory Animal Science*. Revised edition. Amsterdam: Elsevier. p. 428.

Viveiros ATM, Godinho HP. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem*, 35:137-150.

Viveiros ATM, Orfão LH, Maria AN, Allaman IB. 2009. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Anim Reprod Sci*, 112:293-300.

Viveiros ATM, Nascimento AF, Orfão LH, Isaú ZA. 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, 74:551-556.

Viveiros ATM, Amaral TB, Orfão LH, Isaú ZA, Caneppele D, Leal MC.
2011. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes):
effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents
on motility features. *Aquac Res*, 42:858-865.

ARTIGO 2 Gamete quality of streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) after GnRHa and dopamine antagonist treatment

Preparado de acordo com as normas e submetido na revista *Zygote* (ZYG-2013-0030)

Abstract

VIVEIROS, A.T.M.; GONÇALVES, A.C.S.; DI CHIACCHIO, I.M.; NASCIMENTO, A.F.; ROMAGOSA, E.; LEAL, M.C. Gamete quality of streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) after GnRH α and dopamine antagonist treatment.

The efficiency of Ovaprim[™] – salmon GnRH α and dopamine antagonist – on the induction of the spawning and spermiation of *Prochilodus lineatus* in comparison with the common method using pituitary extract (PE) was evaluated. Females received PE at 0.5 + 5.0 mg/kg and Ovaprim[™] at 0.05 + 0.45 mL/kg or at 0.125 + 0.375 mL/kg. All males received a first dose of PE at 0.4 mg/kg and then PE at 4.0 mg/kg or Ovaprim[™] at 0.25 mL/kg. Oocyte, egg, larvae and sperm quality were evaluated. All females spawned and oocyte, egg and larvae quality were similar between ovaprim- (both doses) and PE-treated females. Females' data were pooled and the mean values were: 242 g spawning weight, 15% spawning index, 1,209 oocytes/g ova, 284,539 oocytes/female, 183 oocytes/g body weight, 1.18 mm oocyte diameter, 49% fertilization rate, 43% hatching rate and 89% normal larvae. Sperm quality was similar between ovaprim- and PE-treated males. Males' data were pooled and the mean values of semen were: volume of 3.0 mL, 14.9×10^9 sperm/mL, osmolality of 283 mOsm/kg, pH of 7.4, 71% motile sperm, 217 $\mu\text{m/s}$ curvilinear velocity, 102 $\mu\text{m/s}$ straight-line velocity and 189 $\mu\text{m/s}$ average path velocity. Ovaprim[™] treatment can be used for commercial reproduction of *P. lineatus*, without any loss of gamete quality in comparison with PE treatment.

Keywords: Ovaprim[™]; CASA; Motility; Semen; Oocyte

Resumo

VIVEIROS, A.T.M.; GONÇALVES, A.C.S.; DI CHIACCHIO, I.M.; NASCIMENTO, A.F.; ROMAGOSA, E.; LEAL, M.C. Qualidade gamética de curimatã *Prochilodus lineatus* (Characiformes) após tratamento de GnRH α e antagonista de dopamina.

Foi avaliada a eficiência do Ovaprim[®] – GnRH α de salmão e antagonista de dopamina – sobre a indução da desova e espermiacão de *Prochilodus lineatus* em comparação com o método comum usando extrato de hipófise (EH). Fêmeas receberam EH a 0,5 + 5,0 mg/kg e Ovaprim[®] a 0,05 + 0,45 mL/kg ou a 0,125 + 0,375 mL/kg. Todos os machos receberam a primeira dose de EH a 0,4 mg/kg e, em seguida, EH a 4,0 mg/kg ou Ovaprim[®] a 0,25 mL/kg. Foram avaliados qualidade de ovócito, ovo, larvas e sêmen. Todas as fêmeas desovaram e a qualidade de ovócito, ovo e larvas foram semelhantes entre fêmeas tratadas com Ovaprim[®] (ambas doses) e EH. Dados das fêmeas foram agrupados e os valores médios foram: 242 g de peso de desova, 15% de índice de desova, 1.209 ovócitos/g de ova, 284.539 ovócitos/fêmea, 183 ovócitos/g de peso corporal, 1,18 mm de diâmetro do ovócito, 49% de taxa de fertilização, 43% de taxa de eclosão e 89% de larvas normais. Qualidade do sêmen foi semelhante entre machos tratados com Ovaprim[®] e EH. Dados dos machos foram agrupados e os valores médios de sêmen foram: volume de 3,0 mL, $14,9 \times 10^9$ espermatozoides/mL, osmolalidade de 283 mOsm/kg, pH de 7,4, 71% de espermatozoides móveis, velocidade curvilínea de 217 $\mu\text{m}/\text{segundo}$, velocidade linear de 102 $\mu\text{m}/\text{segundo}$ e velocidade média de percurso de 189 $\mu\text{m}/\text{segundo}$. O tratamento Ovaprim[®] pode ser usado para reprodução comercial de *P. lineatus*, sem qualquer perda de qualidade dos gametas em comparação com o tratamento de EH.

Palavras-chave: Ovaprim[®]; CASA; Motilidade; Sêmen; Ovócito

1. Introduction

The streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) is a migratory Characiformes fish species of the family Prochilodontidae, with a large geographical distribution throughout South America. This fish species is of great importance in Brazilian freshwater aquaculture, where it is known as curimba, curimatá, curimatã or grumatã. *P. lineatus* has been used as a model species for research in a number of studies addressing nutrition, health, genetic diversity and reproduction (Viveiros et al., 2010).

Many fishes exhibit reproductive dysfunctions in captivity. The lack of final oocyte maturation (FOM), ovulation and spawning in cultured fish result from the fact that captive broodstocks do not experience the environmental conditions of the spawning (Zohar & Mylonas, 2001). In these species, induced spawning techniques, such as hormone therapy, are necessary.

Induced ovulation and spermiation techniques have evolved rapidly from the use of simple, gonadotropin-containing, pituitary homogenates (Ihering, 1937) or partially purified piscine gonadotropin preparations (Donaldson et al., 1972) to the use of potent synthetic agonists of gonadotropin releasing hormone (GnRH), associate or not to a dopamine antagonist (Zohar & Mylonas, 2001). The gonadotropins present in the pituitary extract (PE) act directly at gonad level and induce successful spawning in a great variety of fish species. About 40 economically and/or ecologically important fish species in Brazil have been successfully induced to reproduction using this technique (Maria et al., 2012). However, the use of PE is associated with various drawbacks such as the great variability in pituitary LH content, the administration of additional hormones present in the pituitary that may adversely affect the physiology of the treated fish and the potential for transmission of diseases from donor fish to recipient broodstock (Zohar & Mylonas, 2001).

These concerns led the Brazilian Ministry of Agriculture (MAPA) to prohibit the use of PE in some States, including Minas Gerais. However, up to this moment there is no efficient method to induce fish reproduction as PE therapy does, in Brazil.

One therapy that replaces PE in some fish species is the use of GnRH which acts at pituitary level by stimulating the synthesis and release of endogenous gonadotropins (Donaldson et al., 2011). In Characiformes fish, however, the use of GnRH (or LHRH), as spawning or spermiation inducer has been tested in few species with little or no success. In *Brycon cephalus*, none of the 27 GnRH-treated females spawned (Ramos et al., 1997), while in *Piaractus mesopotamicus* only 8 out of 17 GnRH-treated females spawned (Carolsfeld et al., 1988). Furthermore, in *Brycon amazonicus* males treated with GnRH possessed lower semen volume, higher sperm concentration and similar sperm motility rate compared to PE-treated males (Pardo-Carrasco et al., 2006).

Dopamine inhibits the basal release of pituitary gonadotropins and attenuates the action of GnRH on the gonadotrophs (Chang & Peter, 1983). Dopaminergic inhibition differs among fish species and has been demonstrated in Cypriniformes (Szabó et al., 2002), in Siluriformes (Sharaf, 2012; Wang et al., 2010) and appears to be absent in Salmoniformes (Van Der Kraak et al., 1986). Thus, the association of a dopamine antagonist and a GnRH analog is present in some commercial products such Ovaprim[™] that has been used in a wide variety of fishes (Targońska et al., 2010 among others) for aquaculture production, research, conservation, and veterinary purposes. In Characiformes, however, Ovaprim[™] was tested in females of four species (Ferraz de Lima et al., 1988; Cordero et al., 2003; Lenis et al., 2009; Arias Acuña & Hernández Rangel, 2009) and males of one species (Arias Acuña & Hernández Rangel, 2009), with variable and inconclusive results.

Thus, the aim of this study was to evaluate the efficiency of Ovaprim™ on the induction of spawning and spermiation of streaked prochilod *P. lineatus*, in comparison with the common method using PE.

2. Material and Methods

All fish were handled in compliance with published guidelines for animal experimentation described by Van Zutphen et al. (2001).

2.1. Experiment 1. Oocyte, egg and larvae quality

Females (1.6 ± 0.6 kg of BW) originated from earthen ponds of the Hydrobiology and Fish Culture Station of Furnas in the city of São José da Barra, Minas Gerais State, Brazil ($20^{\circ}43'07''$ S; $46^{\circ}18'50''$ W), with detectable running oocytes under soft abdominal pressure were selected. All females received two injections of one of the following hormones: carp PE (Argent Chemical Laboratory, Redmond, Washington, USA) at $0.5 + 5.0$ mg/kg ($n = 4$) which is the routine method to induce spawning in this Fish Culture Station; Ovaprim™ (Syndel Laboratories Ltd., Qualicum Beach, BC, Canada) at $0.05 + 0.45$ mL/kg ($n = 4$); and Ovaprim™ at $0.125 + 0.375$ mL/kg ($n = 6$). One mL of Ovaprim™ contains 20 μ g of salmon GnRHa and 10 mg of domperidone. The interval between injections was always 14 h and the oocytes were hand-stripped after 7.5 h at approximately 27°C. Spawning weight, spawning index (spawning weight \times 100/g body weight), number of oocytes/g ova, number of oocytes/female and number of oocytes/g BW were evaluated.

Three aliquots of oocytes from each female were collected. The first aliquot ($n = \sim 35$ oocytes \times 14 females) was fixed in Gilson's solution (50 mL 60% ethanol, 440 mL distilled water, 7 mL nitric acid, 10 g mercuric chloride, 9

mL glacial acetic; Simpson, 1951) for 30 min. The diameter of each oocyte was determined under a light microscope (Model L1000, Bioval, Jiangbei, China), at 40 x magnification, using micrometric objective, according to Isaú et al. (2013). The second aliquot ($n = \sim 100$ oocytes x 14 females) was fixed in Serra's solution (60 ml 90% ethanol, 30 ml 37% formaldehyde, 10 ml glacial acetic; Brzuska, 1979) and the germinal vesicle position was examined under a stereomicroscope (Model SZ51, Olympus, Shanghai, China). The germinal vesicle position was classified as central when germinal vesicle was displaced to eccentric position and as peripheric-breakdown, when germinal vesicle was migrating to the periphery of the oocyte or was absent (breakdown). The third aliquot of oocyte was tested for fertilization. For such, sperm from nine males was collected after a single dose of carp PE at 3 mg/kg, according to the routine station. Sperm was pooled and diluted in glucose solution at 315 mOsm/kg to an average concentration of 121×10^7 sperm/mL. Then, 100 μ L of diluted sperm was mixed with 0.2 g oocytes (~ 242 oocytes) from each of the 14 females, producing an approximate ratio of 5×10^5 sperm:oocyte. Fertilization was initiated by the addition of 5 mL tank water, and homogenized for 1 min. Subsequently, 10 mL tank water was added, and samples mixed for another 1 min. Finally, eggs were transferred to a PVC basket, 10 cm in diameter, with a 0.5 mm mesh bottom (Viveiros et al., 2002), and incubated in a flow-through system at 24°C. In total, 28 batches of eggs were fertilized (2 batches of eggs x 14 females).

Fertilization rate (as the number of fertilized eggs x 100/total number of eggs) was determined 9 h after fertilization at 24°C. Hatching rate (as the number of hatched larvae x 100/total number of eggs) and percentage normal larvae (as the number of normal larvae x 100/total number of larvae) were determined 21 h after fertilization.

2.2. Experiment 2. Sperm quality

Males (0.9 ± 0.5 kg of BW) originated from the Fish Culture Station of the Minas Gerais Power Company (CEMIG) in the city of Itutinga ($21^{\circ}17'36''$ S; $44^{\circ}37'02''$ W), Minas Gerais State, Brazil, with detectable running sperm under soft abdominal pressure were selected. All males received one dose of catfish PE (*Clarias fuscus*; Destiny Land Enterprise Co., Ltd., Taiwan) at 0.4 mg/kg. After 12 h, 19 males received a second dose of catfish PE at 4.0 mg/kg (PE-treated males) which is the routine method to induce spermiation in this Fish Culture Station; 15 males received one dose of Ovaprim™ at 0.25 mL/kg (ovaprim-treated males). Six hours later at approximately 27°C, the urogenital papilla was carefully dried and sperm was hand-stripped directly into glass tubes. Immediately after collection, the tubes containing sperm were placed in a cooler (9-11°C) containing dry ice foam (Polar Technics CRI Ltd., Brazil) and transported approximately 40 km by car from CEMIG to the Laboratory of Semen Technology of the Federal University of Lavras – UFLA, in the city of Lavras, Minas Gerais State, Brazil.

Sperm concentration (hemacytometer/Neubauer chamber; Boeco, Hamburg, Germany), semen osmolality (Semi-Micro Osmometer K-7400, Knauer, Berlin, Germany) and semen pH (pHmeter DM-22, Digimed, São Paulo, Brazil) were determined in all samples. It was possible to centrifuge (2000 x g for 30 min; MiniStar, Shanghai, China) sperm to obtain seminal plasma of only 8 ovaprim- and 12 PE-treated males. In those seminal plasma samples, both osmolality and pH were measured.

Sperm motility and velocities were evaluated in all samples using a computer-assisted sperm analyzer (CASA). Sperm was first diluted 1:100 in BTS™ solution (Beltsville Thawing Solution, Minitub™, Tiefenbach/Landshut, Germany) at 325 mOsm/kg. BTS™ is composed of 79.9% glucose, 12.7%

sodium citrate, 2.7% EDTA, 2.7% NaHCO₃, 1.5% KCl and 0.5% gentamycin sulfate. Then diluted sperm was activated in an hyposmotic NaCl solution at 98 mOsm/kg directly in a Makler™ counting chamber (Sefi-Medical Instruments ltd, Haifa, Israel) to a final dilution ratio of 1:500, according to the routine method to evaluate *P. lineatus* sperm under CASA in our laboratory (Viveiros et al., 2010). The Makler™ counting chamber was placed under a phase-contrast microscope (Nikon Eclipse E200, Tokyo, Japan) at 100 x magnification with a green filter and pH 1 position. The microscope was connected to a video camera (Basler Vision Technologies™ A602FC, Ahrensburg, Germany) generating 100 images/s; video recording started 10 s post-activation. Each image was analyzed using the adjusted settings for fish by Sperm Class Analyzer™ software (SCA™ 2010, Microptics, S.L. Version 5.1, Barcelona, Spain). Sperm was considered immotile when velocity was < 40 μm/s. Although the SCA™ simultaneously assesses more than 15 sperm motility endpoints, for brevity, only motility rate, curvilinear velocity (VCL), straight-line velocity (VSL) and average path velocity (VAP) were considered for analysis. To determine these parameters, each individual sperm (a mean of 419 sperm/field) was followed throughout the images and sperm trajectory was calculated.

2.3. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD). Statistical analyses were conducted using the computational program of R Development Core Team (2010). Data were evaluated for normal distribution using the univariate procedure. When data did not fit the normal distribution, an arcsin transformation was performed. Statistical significance was tested using analysis of variance (ANOVA) followed by the SNK test, when applicable. The level of significance for all statistical tests was set at 5% ($P < 0.05$).

3. Results

3.1. Experiment 1. Oocyte, egg and larvae quality

All females responded to the Ovaprim™ and PE treatments and were thus hand-stripped. Oocyte, egg and larvae quality of ovaprim-treated females (both doses) were not different ($P > 0.05$) from PE-treated females (Table 1). All together, these 14 females (pooled data) possessed a mean spawning weight of 242 g, 15% of spawning index, 1,209 oocytes/g ova, 284,539 oocytes/female, 183 oocytes/g BW and oocyte diameter of 1.18 mm. The percentage of frequency distribution of the oocyte diameter presented unimodal tendency, with mode at 1.15 mm in ovaprim-treated females (both doses) and at 1.28 mm in PE-treated females (Fig. 1). Oocyte maturation was advanced as 98% of the stripped oocytes possessed germinal vesicle peripheric or breakdown. Nine hours after fertilization, 49% of the eggs were fertilized and all embryos were at gastrula stage, with approximately 100% epiboly (blastopore closure). Hatching occurred 21 h after fertilization in 43% of the total eggs, and 89% of the hatched larvae were normal (Table 1).

Table 1 Female body weight (BW), oocyte, egg and embryo quality (mean \pm SD) of *Prochilodus lineatus* after pituitary extract (PE) or Ovaprim™ treatment.

Parameters	Hormone treatment						Overall mean ⁵
	PE		Ovaprim™		Ovaprim™		
	(0.5 + 5.0 mg/kg)		(0.05 + 0.45 mL/kg)		(0.125 + 0.375 mL/kg)		
	Mean \pm SD	Min - Max	Mean \pm SD	Min - Max	Mean \pm SD	Min - Max	
Number spawned/treated females	4/4	-	4/4	-	6/6	-	14/14
Body weight (kg)	1.9 \pm 0.9	0.9 - 2.9	1.5 \pm 0.4	1.0 - 2.0	1.5 \pm 0.4	1.1 - 2.0	1.6 \pm 0.6
Spawning weight (g)	304 \pm 146	162 - 487	221 \pm 36	189 - 270	214 \pm 126	64 - 398	242 \pm 114
Spawning index (%) ¹	17 \pm 1	15 - 18	16 \pm 3	13 - 20	14 \pm 6	5 - 20	15 \pm 4
Number of oocytes/g ova	1,211 \pm 144	1,030 - 1,353	1,257 \pm 136	1,110 - 1,432	1,177 \pm 126	1,007 - 1,369	1,209 \pm 128
Number of oocytes/female	352,465 \pm 129,278	209,628 - 501,610	279,311 \pm 64,616	209,790 - 345,060	242,741 \pm 122,651	75,692 - 426,258	284,539 \pm 113,316
Number of oocytes/g BW	202 \pm 33	173 - 236	196 \pm 47	140 - 245	162 \pm 56	58 - 219	183 \pm 48
Oocyte diameter (mm)	1.20 \pm 0.06	1.02 - 1.36	1.15 \pm 0.02	1.00 - 1.36	1.17 \pm 0.03	1.00 - 1.33	1.18 \pm 0.04
Germinal vesicle peripheric-breakdown (%)	99 \pm 1	97 - 100	97 \pm 2	95 - 99	98 \pm 3	91 - 100	98 \pm 2
Fertilization rate (%) ²	46 \pm 37	8 - 96	48 \pm 32	0 - 66	52 \pm 32	0 - 88	49 \pm 31
Hatching rate (%) ³	39 \pm 36	6 - 90	39 \pm 27	0 - 57	48 \pm 31	0 - 83	43 \pm 29
Normal larvae (%) ⁴	82 \pm 19	56 - 99	94 \pm 4	89 - 97	92 \pm 3	89 - 97	89 \pm 11

Ovaprim™ = sGnRH α at 20 μ g and domperidone at 10 mg per mL.

¹ Spawning index = spawning weight x 100/g body weight.

² Fertilization rate = number of fertilized eggs x 100/total number of eggs.

³ Hatching rate = number of hatched larvae x 100/total number of eggs.

⁴ Percentage normal larvae = number of normal larvae x 100/total number of larvae.

⁵ There was no effect ($P > 0.05$) of hormonal treatment on any of the parameters tested, thus data from all female was pooled (overall mean).

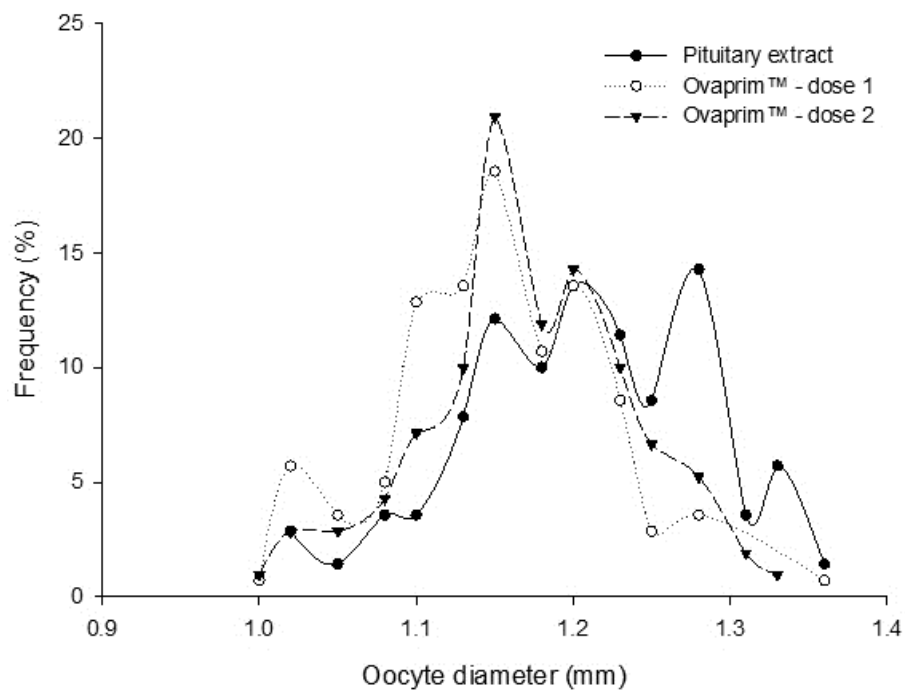


Figure 1 Frequency distribution of stripped oocytes diameter of *P. lineatus* after pituitary extract (PE) or Ovaprim™ treatment. Lines with different symbols indicate the three different treatments: PE at 0.5 + 5.0 mg/kg, Ovaprim™ at 0.05 + 0.45 mL/kg (dose 1) and Ovaprim™ at 0.125 + 0.375 mL/kg (dose 2).

3.2. Experiment 2. Sperm quality

One ovaprim- and one PE-treated males did not release sperm after hormone treatment; the other males were stripped. Sperm quality parameters of ovaprim-treated males were not different ($P > 0.05$) from PE-treated males (Table 2). All together, these 32 males (pooled data) possessed a mean semen volume of 3.0 mL, concentration of 14.9×10^9 sperm/mL, semen osmolality of 283 mOsm/kg and semen pH of 7.4.

When possible, osmolality and pH values were compared between semen and seminal plasma of the same males. Osmolality was always higher in semen (286 mOsm/kg in ovaprim- and 281 mOsm/kg in PE-treated males) compared to seminal plasma (278 mOsm/kg in ovaprim- and 257 mOsm/kg in PE-treated males). On the other hand, pH was always lower in semen (7.4 in both ovaprim- and PE-treated males) compared to seminal plasma (7.9 in ovaprim- and 8.0 in PE-treated males).

Under CASA evaluation, sperm of ovaprim-treated males were not different ($P > 0.05$) from PE-treated males and yielded a mean motility rate of 71%, VCL of 217 $\mu\text{m/s}$, VSL of 102 $\mu\text{m/s}$ and VAP of 189 $\mu\text{m/s}$ (Table 2).

Table 2 Male body weight and sperm quality (mean \pm SD) of *Prochilodus lineatus* after pituitary extract (PE) or Ovaprim™ treatment. All males received an initial dose of PE at 0.4 mg/kg, 12 h before PE or Ovaprim™ treatment.

Parameters	Hormone treatment				Overall mean ¹
	PE (4.0 mg/kg)		Ovaprim™ (0.25 mL/kg)		
	Mean \pm SD	Min - Max	Mean \pm SD	Min - Max	
Number of spermiated/treated males	18/19	-	14/15	-	32/34
Body weight (kg)	0.9 \pm 0.5	0.4 - 1.7	0.9 \pm 0.5	0.5 - 1.7	0.9 \pm 0.5
Semen volume (mL)	3.0 \pm 1.9	0.6 - 7.4	3.0 \pm 1.9	1.0 - 8.6	3.0 \pm 1.9
Concentration (sperm $\times 10^9$ /mL)	15.9 \pm 9.9	4.0 - 34.9	13.6 \pm 9.9	3.1 - 34.0	14.9 \pm 9.8
Semen osmolality (mOsm/kg)	281 \pm 17	259 - 317	286 \pm 10	273 - 301	283 \pm 15
Semen pH	7.4 \pm 0.1	7.3 - 7.5	7.4 \pm 0.2	6.9 - 7.6	7.4 \pm 0.2
Motility rate (%)	65 \pm 21	37 - 99	76 \pm 11	50 - 90	71 \pm 18
Curvilinear velocity (μ m/s)	207 \pm 49	138 - 293	227 \pm 43	162 - 310	217 \pm 47
Straight-line velocity (μ m/s)	92 \pm 24	65 - 141	113 \pm 23	78 - 151	102 \pm 25
Average path velocity (μ m/s)	179 \pm 44	114 - 255	199 \pm 42	131 - 272	189 \pm 44

Ovaprim™ = sGnRH α at 20 μ g and domperidone at 10 mg per mL.

¹ There was no effect ($P > 0.05$) of hormonal treatment on any of the parameters tested, thus data from all males was pooled (overall mean).

4. Discussion

Pituitary extract (PE) is the most wide world method to induce fish reproduction. The gonadotropins present in the PE act directly at gonad level and induce successful spawning in a great variety of fish species, including the Characiformes *P. lineatus*. However, there are concerns about using PE (Zohar & Mylonas, 2001) that led the Ministry of Agriculture in Brazil to prohibit the use of PE in some States. In the present study, the use of Ovaprim™ on the induction of spawning and spermiation of *P. lineatus* as a replacement for PE therapy was evaluated.

4.1. Spawning quality

Ovaprim™ treatment (both doses) did not affect the number of spawned *P. lineatus* female, oocyte quality, fertilization rate, hatching rate or the percentage of normal larvae when compared to PE-treated females. All the observed values were within the range described in the literature for species of the genus *Prochilodus* (Cordero et al., 2003; Viveiros et al., 2010; Viveiros et al., 2009; among others).

According to the literature (Table 3), it is easy to observe that Characiformes females treated with a single or double dose of GnRH do not spawn (*B. cephalus*; Ramos et al., 1997) or spawn only after very high doses (*P. mesopotamicus*; Carolsfeld et al., 1988). When GnRH was injected after PE treatment, 0 out of 9 *B. siebenthalae* (Pardo-Carrasco et al., 2002), 5 out of 8 *P. mesopotamicus* (Carolsfeld et al., 1988) and 4 out of 6 *P. mesopotamicus* (Zaniboni-Filho, 1995) females spawned. However, the number of females per treatment was too reduced to draw any conclusion. When the association of GnRH and a dopamine antagonist was administered in a single dose, 2 out of 3

C. macropomum (Arias Acuña & Hernández Rangel, 2009), no *P. mesopotamicus* (Ferraz de Lima et al., 1988) and 5 out of 12 *P. magdalanae* (Cordero et al., 2003) females spawned. However, when this association was administered in two injections, all *B. henni* (Lenis et al., 2009), 4 out of 12 *P. mesopotamicus* (Ferraz de Lima et al., 1988) and all *P. lineatus* (present study) females spawned.

Based on these results, it is possible that Characiformes female is sensitive to the dopaminergic inhibition of gonadotropin release to a certain degree, and that this sensitivity is species-dependent. Furthermore, to be effective, GnRH plus dopamine antagonist therapy should be administered in two different injections, similarly to PE therapy.

Table 3 Oocyte quality of Characiformes fish species after induction with gonadotropin releasing hormone (GnRH or LHRH) analog combined or not with a dopamine antagonist (domperidone or metoclopramide), and compared to pituitary extract (PE).

Family/Species	Dose/kg body weight	Result	Reference
Prochilodontidae/ <i>P. lineatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • (GnRH + domp)⁴ + (GnRH + domp)⁴ = (1 µg + 0.5 mg) + (9 µg + 4.5 mg) • (GnRH + domp)⁴ + (GnRH + domp)⁴ = (2.5 µg + 1.25 mg) + (7.5 µg + 3.75 mg) • PE + PE = 0.5 + 5 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 4 spawned/4 treated females; 221 g spawning weight; 48% fertilization rate; 39% hatching rate • 6 spawned/6 treated females; 214 g spawning weight; 52% fertilization rate; 48% hatching rate • 4 spawned/4 treated females; 304 g spawning weight; 46% fertilization rate; 39% hatching rate 	Present study
Prochilodontidae/ <i>P. magdalenae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • (GnRH + domp)⁴ = (14 µg + 7 mg) • PE + PE = 1.2 + 4.8 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 spawned/12 treated females; 82% fertilization rate; 59% hatching rate • 11 spawned/12 treated females; 89% fertilization rate; 63% hatching rate 	Cordero et al., 2003
Characidae/ <i>B. siebenthalae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • PE + GnRH¹ = 0.25 mg + 20 µg • PE + GnRH¹ = 0.25 mg + 50 µg • PE + GnRH¹ = 0.25 mg + 100 µg • PE + PE + PE = 0.25 + 0.5 + 5 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 0 spawned/3 treated females • 0 spawned/3 treated females • 0 spawned/3 treated females • 2 spawned/4 treated females; 91% fertilization rate 	Pardo-Carrasco et al., 2002
Characidae/ <i>B. cephalus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • LHRH² + LHRH² = 2 + 2 µg • LHRH² + LHRH² = 2 + 6 µg • LHRH² + LHRH² = 2 + 8 µg • LHRH² = 4 µg • LHRH² = 8 µg • LHRH² = 10 µg • PE + PE = 0.5 + 5 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 0 spawned/3 treated females • 0 spawned/3 treated females • 0 spawned/3 treated females • 0 spawned/3 treated females • 0 spawned/3 treated females • 0 spawned/3 treated females • 2 spawned/3 treated females; 350 g spawning weight; 80% fertilization rate; 80% hatching rate 	Ramos et al., 1997

	<ul style="list-style-type: none"> • LHRH³ + LHRH³ = 25 + 25 µg • LHRH³ + LHRH³ = 50 + 50 µg • LHRH³ + LHRH³ = 50 + 100 µg • PE + PE = 0.5 + 5 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 0 spawned/3 treated females • 0 spawned/3 treated females • 0 spawned/3 treated females • 3 spawned/3 treated females; 1,100 g spawning weight; 70% fertilization rate; 50% hatching rate 	Ramos et al., 1997
Characidae/ <i>B. henni</i>	<ul style="list-style-type: none"> • (GnRH + domp)⁴ + (GnRH + domp)⁴ = (1 µg + 0.5 mg) + (9 µg + 4.5 mg) • (GnRH + metoc)⁵ + (GnRH + metoc)⁵ = (2 µg + 1 mg) + (18 µg + 9 mg) • PE + PE = 0.5 + 5 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 4 spawned/4 treated females; 86% fertilization rate • 4 spawned/4 treated females; 80% fertilization rate • 3 spawned/4 treated females; 0% fertilization rate 	Lenis et al., 2009
Characidae/ <i>C. macropomum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • (GnRH + domp)⁴ = (10 µg + 5 mg) • PE = 5 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 spawned/3 treated females; 715 g spawning weight; 11% fertilization rate • 3 spawned/3 treated females; 339 g spawning weight; 63% fertilization rate 	Arias Acuña & Hernández Rangel, 2009
Characidae/ <i>P. mesopotamicus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • LHRH⁶ = 5 µg • LHRH⁶ = 50 µg • LHRH⁶ = 100 µg • LHRH⁷ + LHRH⁷ = 25 + 25 µg • PE + LHRH⁷ = 5 mg + 5 µg • PE + LHRH⁷ = 5 mg + 50 µg • PE = 5 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 0 spawned/4 treated females • 0 spawned/4 treated females • 3 spawned/3 treated females • 5 spawned/6 treated females • 1 spawned/4 treated females • 4 spawned/4 treated females • 1 spawned/4 treated females 	Carolsfeld et al., 1988
	<ul style="list-style-type: none"> • (GnRH + domp)⁴ = (10 µg + 5 mg) • (GnRH + domp)⁴ + (GnRH + domp)⁴ = (5 µg + 2.5 mg) + (5 µg + 2.5 mg) • PE + PE = 0.5 + 5 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 0 spawned/3 treated females • 2 spawned/3 treated females; 375 g spawning weight; 43% fertilization rate; 48% hatching rate • 4 spawned/8 treated females; 331 g spawning weight; 88% fertilization rate; 76% hatching rate 	Ferraz de Lima et al., 1988

<ul style="list-style-type: none"> • (GnRH + domp)⁴ + (GnRH + domp)⁴ = (2 µg + 1 mg) + (5 µg + 2.5 mg) • (GnRH + domp)⁴ + (GnRH + domp)⁴ = (5 µg + 2.5 mg) + (5 µg + 2.5 mg) • (GnRH + domp)⁴ + (GnRH + domp)⁴ = (10 µg + 5 mg) + (5 µg + 2.5 mg) • PE + PE = 0.5 + 5 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 spawned/3 treated females; 108 g spawning weight; 80% fertilization rate; 80% hatching rate • 0 spawned/3 treated females • 1 spawned/3 treated females; 113 g spawning weight; natural spawning • 2 spawned/4 treated females; 138 g spawning weight; 89% fertilization rate; 87% hatching rate 	Ferraz de Lima et al., 1988
<ul style="list-style-type: none"> • PE + LHRH⁸ + LHRH⁸ = 0.25 mg + 1 µg + 10 µg • PE + LHRH⁸ + LHRH⁸ = 0.25 mg + 1.5 µg + 15 µg • PE + LHRH⁸ + LHRH⁸ = 0.25 mg + 2 µg + 20 µg • PE + PE + PE = 0.25 + 0.5 + 4.5 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 spawned/2 treated females; 140 g spawning weight; 25% fertilization rate • 2 spawned/2 treated females; 200 g spawning weight; 42% fertilization rate • 0 spawned/2 treated females • 2 spawned/2 treated females; 240 g spawning weight; 50% fertilization rate 	Zaniboni-Filho, 1995

¹ mammalian GnRH_a (Argent Laboratories).

² buserelin acetate (Hoechst).

³ gonadorelin acetate (Serono Ltd).

⁴ salmon GnRH_a and domperidone (Ovaprim™; Syndel Laboratories Ltd.).

⁵ mammalian GnRH_a and metoclopramide (Ovopel™; Sigma Co.).

⁶ LHRH_a (Ningbo Sansheng Pharmaceutical Co.,Ltd.).

⁷ LHRH_a (Syndel Laboratories Ltd.).

⁸ LHRH_a (Sigma Co.).

4.2. Sperm quality

In the present study, only one male of each hormone treatment did not respond; all the other ovaprim- and PE-treated males released sperm after hormone injection.

Sperm quality was similar between ovaprim- and PE-treated males and was all within the range previously reported for this fish species (Godinho & Viveiros, 2011; Viveiros & Godinho, 2009; among others). Similarly, the Characiformes *C. macropomum* (Arias Acuña & Hernández Rangel, 2009) and the Osmeriformes *Osmerus eperlanus* (Król et al., 2009) males produced similar sperm quality after Ovaprim™ and PE therapy. Contrarily, the Cypriniformes *Leuciscus leuciscus* males produced better sperm quality after Ovaprim™ therapy compared to PE, Ovopel™ and LHRHa treatments (Cejko et al., 2012).

Hormone therapy in males exerts a mild effect compared to females. In males, hormones are injected to increase testicular hydration which, in turn, increases seminal plasma release, decreases sperm viscosity, and thus facilitates sperm flow (Viveiros et al., 2002). According to our results and to the literature (Table 4), Characiformes males are less specific to hormone therapy than females, and release sperm after a single dose of GnRH (Pardo-Carrasco et al., 2006), a single dose of GnRH plus a dopamine antagonist (Arias Acuña & Hernández Rangel, 2009), a single or double dose of PE (Arias Acuña & Hernández Rangel, 2009; Pardo-Carrasco et al., 2006; Zaniboni-Filho, 1995; present study) or after the combination of PE and GnRH plus a dopamine antagonist therapy (present study).

Table 4 Sperm quality of Characiformes fish species induced with a gonadotropin releasing hormone (GnRH or LHRH) analog combined or not with a dopamine antagonist (domperidone), and compared to pituitary extract (PE).

Family/Species	Dose/kg body weight	Result	Reference
Prochilodontidae/ <i>P. lineatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • PE + (GnRH + domp.)² = 0.4 mg + (5 µg + 2.5 mg) • PE + PE = 0.4 + 4 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 14 spermiated/15 treated males; 3 mL semen volume; 13.6 x 10⁹ sperm/mL; 76% motile sperm^C • 18 spermiated/19 treated males; 3 mL semen volume; 15.9 x 10⁹ sperm/mL; 65% motile sperm^C 	Present study
Characidae/ <i>B. amazonicus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • GnRH¹ = 10 µg • GnRH¹ = 15 µg • GnRH¹ = 20 µg • PE + PE = 0.44 + 3.96 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 6 spermiated/6 treated males; 1.5 mL semen volume; 19.3 x 10⁹ sperm/mL; 72% motile sperm^S • 4 spermiated/6 treated males; 1.4 mL semen volume; 19.1 x 10⁹ sperm/mL; 86% motile sperm^S • 6 spermiated/6 treated males; 1.5 mL semen volume; 14.3 x 10⁹ sperm/mL; 69% motile sperm^S • 6 spermiated/6 treated males; 6.2 mL semen volume; 8.5 x 10⁹ sperm/mL; 49% motile sperm^S 	Pardo-Carrasco et al. 2006
Characidae/ <i>C. macropomum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • (GnRH + domp.)² = (10 µg + 5 mg) • PE = 1.5 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 spermiated/3 treated males; 6.8 mL semen volume; 4.0 x 10⁹ sperm/mL • 3 spermiated/3 treated males; 6.3 mL semen volume; 6.7 x 10⁹ sperm/mL 	Arias Acuña and Hernández Rangel 2009
Characidae/ <i>P. mesopotamicus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • PE + LHRH³ = 0.25 mg + 5 µg • PE + LHRH³ = 0.25 mg + 7 µg • PE + LHRH³ = 0.25 mg + 10 µg • PE + PE = 0.25 + 2 mg 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 spermiated/2 treated males; 9 mL semen volume • 2 spermiated/2 treated males; 10.9 mL semen volume • 2 spermiated/2 treated males; 14.4 mL semen volume • 2 spermiated/2 treated males; 12.1 mL semen volume 	Zaniboni-Filho 1995

¹ mammalian GnRH_a (Sigma Co.).

² salmon GnRH_a and domperidone (Ovaprim™; Syndel Laboratories Ltd.).

³ LHRH_a (Sigma Co.).

^S motility rate evaluated subjectively under a light microscope.

^C motility rate evaluated under a Computer-Assisted Sperm Analyzer (CASA).

5. Conclusions

Ovaprim[™] can successfully replace pituitary extract treatment on the induction of spawning and spermiation in *P. lineatus* without any loss of gamete quality. Therefore, this method is a useful tool for commercial hatcheries of Characiformes fish to ensure spawning success.

Acknowledgments

This study received funding from the Brazilian fostering agencies CNPq (A.T.M.V., grant number PQ 302434/2011-9; A.C.S.G., grant number 554950/2009-0; project 471393/2011-8), ANEEL P&D Furnas (project 017965) and FAPEMIG (project 00129-11; M.C.L., grant number BPD 00216-11). The authors thank the undergraduate students L.F.R. Pereira and M.A.G. Lemes (UFLA), the MSc students T.R. Taffarel (UFLA) and D. Rossetto (UNIOESTE), the biologists D.M. Ribeiro and M.B. Goulart (Furnas), and the staffs F.H. Siqueira, G.A. Azarias and J.M. Silva (CEMIG) for assistance during the experiments.

References

Arias Acuña, J.J. & Hernández Rangel, J.L. (2009). Efectos del extracto hipofisiario de carpa común y el análogo de la GnRH sobre la maduración final del oocito y el desove de la cachama negra (*colossoma macropomum*). Rev. Científ. FCV-LUZ 19:486-494.

Brzuska, E. (1979). The in vivo method of estimating the stages of oocyte maturation in carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Hydrobiol. 21:423-433.

Carolsfeld, J., Ramos, S.M., Ormanezi, R., Gomes, J.H., Barbosa, J.M. & Harvey, B. (1988). Analysis of protocols for application of a LHRH analog for induced final maturation and ovulation of female pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887). Aquaculture 74:49-55.

Cejko, B.I., Targońska, K., Kowalski, R.K., Żarski, D., Sarosiek, B., Kucharczyk, D. & Glogowski, J. (2012). The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). J. Appl. Ichthyol. 28:873-877.

Chang, J.P. & Peter, R.E. (1983). Effects of pimoziide and Des Gly¹⁰, (D-Ala⁶) luteinizing hormone releasing hormone ethylamide on serum gonadotropin concentrations, germinal vesicle migration and ovulation in female goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol. 52:30-37.

Cordero, C.A., Pertuz, B.V. & Solano, J.G. (2003). Reproducción inducida del bocachico (*Prochilodus magdalenae* Steindachner, 1878) con Ovaprim[®]. Rev. MVZ-Córdoba 8:335.

Donaldson, E.M., Yamazaki, F., Dye, H.M. & Philleo, W.W. (1972). Preparation of gonadotropin from salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) pituitary glands. Gen. Comp. Endocrinol. 18:469-481.

Donaldson, E.M., Solar, I.I. & Harvey, B. (2011). Induced ovulation and spermiation, and factors influencing gamete quality. In: T.R. Tiersch, C.C. Green (Org.). Cryopreservation in Aquatic Species, 2nd ed., The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. pp. 37-45

Ferraz de Lima, J.A., Carolsfeld, J., Ramos, S.M., Alcântara, R.C.G. & Ramos, R.O. (1988). Uso de “Ovaprim” [combinação de um antagonista da dopamina (domperidona) mais um análogo do hormônio liberador de gonadotropina de salmão (sGnRH-A)] na indução da desova do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criado em cativeiro. Bol. Téc. CEPTA 1:1-9.

Godinho, H.P. & Viveiros, A.T.M. (2011). Current status of sperm cryopreservation of Brazilian Characiform fishes. In: T.R. Tiersch, C.C. Green (Org.). Cryopreservation in Aquatic Species, 2nd ed., The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. pp. 875-884.

Ihering, R. von (1937). A method for inducing fish to spawn. Progr. Fish. Cult. 34:15-16.

Isaú, Z.A., Rizzo, E., Amaral, T.B., Mourad, N.M.N. & Viveiros, A.T.M. (2013). Structural analysis of oocytes, post-fertilization events and embryonic development of the Brazilian endangered teleost *Brycon insignis* (Characiformes). Zygote 21:85-94.

Król, J., Kowalski, R.K., Hliwa, A., Dietrich, G.J., Stabiński, R. & Ciereszko, A. (2009). The effects of commercial preparations containing two different GnRH analogues and dopamine antagonists on spermiation and sperm characteristics in the European smelt *Osmerus eperlanus* (L.). *Aquaculture* 286:328-331.

Lenis, G.A., Restrepo, L.F. & Cruz-Casallas, P.E. (2009). Evaluación de tres protocolos de tratamiento hormonal sobre el diámetro de ovocitos de sabaleta *Brycon henni*. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 22:131-142.

Maria, A.N., Azevedo, H.C., Santos, J.P. & Carneiro, P.C.F. (2012). Hormonal induction and sêmen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. *Zygote* 20:39-43.

Pardo-Carrasco, S.C., Suarez-Mahecha, H., Muñoz-Lara D., Arias-Castellanos, J.A. & Gil, H. (2002). Inducción de la ovulación y del desove del yamú, *Brycon siebenthalae*, com implantes de mGnRH-a. *Bol. Inst. Pesca* 28:19-24.

Pardo-Carrasco, S.C., Zaniboni-Filho, E., Arias-Castellanos, J.A., Suárez-Mahecha, H., Atencio-García, V.J. & Cruz-Casallas, P.E. (2006). Evaluation of milt quality of the yamú *Brycon amazonicus* under hormonal induction. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 19:134-139.

R Development Core Team. (2010). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Version 2.12.0. R Foundation for Statistical Computing.

Ramos, R.O., Ramos, S.M. & Mendonça, J.O.J. (1997). Utilização de análogos do LHRH na indução à ovulação do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Bol. Téc. CEPTA* 10:1-7.

Simpson, A.C. (1951). The fecundity of the plaice. Fish. Investig. Series II 17:1-27.

Sharaf, S.M. (2012). Effect of GnRH α , pimozide and Ovaprim on ovulation and plasma sex steroid hormones in African catfish *Clarias gariepinus*. Theriogenology 77:1709-1716.

Szabó, T., Medgyasszay, C. & Horváth, L. (2002). Ovulation induction in nase (*Chondrostoma nasus*, Cyprinidae) using pituitary extract or GnRH analogue combined with domperidone. Aquaculture 203:389-395.

Targońska, K., Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamcarz, A. & Żarski, D. (2010). Controlled reproduction of asp, *Aspius aspius* (L.) using luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) analogues with dopamine inhibitors. Aquaculture 306:407-410.

Van Der Kraak, G., Donaldson, E.M. & Chang, J.P. (1986). Dopamine involvement in the regulation of gonadotropin secretion in coho salmon. Can. J. Zool. 64:1245-1248.

Van Zutphen, L.F.M., Baumans, V. & Beynen, A.C. (2001) Principles of laboratory animal science. Revised ed. Amsterdam: Elsevier. 428 pp.

Viveiros, A.T.M., Fessehayé, Y., Ter Veld, M., Schulz, R.W. & Komen, J. (2002). Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. Aquaculture 213:373-386.

Viveiros, A.T.M. & Godinho, H.P. (2009). Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish. Physiol. Biochem.* 35:137-150.

Viveiros, A.T.M., Orfão, L.H., Maria, A.N. & Allaman, I.B. (2009). A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 112:293-300.

Viveiros, A.T.M., Nascimento, A.F., Orfão, L.H. & Isaú, Z.A. (2010). Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology* 74:551-556.

Wang, Y., Hu, M., Cheung, S.G., Shin, P.K.S., Song, L. & Wang, W. (2010). Induced ovulation of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) using a combination of a gonadotrop-releasing hormone analogue and domperidone. *Aquac. Res.* 41:1243-1249.

Zaniboni-Filho, E. (1995). Utilização do LHRH-a para indução à espermiacção e desova do Pacu-caranha, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887). *Biotemas* 8:36-45.

Zohar, Y. & Mylonas, C.C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197:99-136.

“ VERSÃO PRELIMINAR ”