



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA



**Ovulação de matrizes de pacu *Piaractus mesopotamcius* e o papel
da prostaglandina F_{2α}**

**Eduardo Criscuolo Urbinati
Biólogo**

Jaboticabal – São Paulo

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA



Ovulação de matrizes de pacu *Piaractus mesopotamcius* e o papel da prostaglandina $F_{2\alpha}$

Mestrando: Eduardo Criscuolo Urbinati

Orientador: Sergio Ricardo Batlouni

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Caunesp como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura

Jaboticabal – São Paulo

2012

Urbinati, Eduardo Criscuolo

U73o Ovulação de matrizes de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o papel da prostaglandina F_{2α} / Eduardo Criscuolo Urbinati – – Jaboticabal, 2012

viii, 36 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - 2012

Orientadora: Sergio Ricardo Batlouni

Banca examinadora: Renata Guimarães Moreira, José Augusto Senhorini

Bibliografia

1. *Piaractus mesopotamicus*. 2. Prostaglandina F_{2α}. 3. Ovulação. 4. Folículo ovário I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura (CAUNESP) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.3.03

DEDICO

*Aos meus pais, José Eduardo e Elisabeth e
minhas irmãs Heloísa, Carolina e Marília pela
confiança, apoio e amor.*

*A minha amada e querida esposa, Fabiana, que
sempre esteve ao meu lado e fez de tudo para
que eu pudesse alcançar meus objetivos.*

Ao meu orientador e amigo Dr. Sergio Ricardo Batlouni, pela paciência, confiança e também por todas as oportunidades oferecidas para meu desenvolvimento intelectual e profissional.

Aos professores Elizabeth Romagosa, Carlos Vicentini, Renata Guimarães Moreira e José Augusto Senhorini, pela participação e pelas sugestões na qualificação e defesa.

Aos meus pais pelo exemplo de união que vocês são para mim, sempre me apoiando e me incentivando as melhores decisões.

A minhas irmãs Heloisa, Carolina e Marilia pelo companheirismo, amor e incentivo.

Aos meus sobrinhos Angelo, Valentina e Miguel.

A minha esposa amada, Fabiana, por estar sempre ao meu lado, pela paciência e companheirismo. Obrigada pelas conversas que sempre me incentivaram e me deram força para seguir em frente. Além de meu amor, minha amiga.

Ao pessoal do Laboratório de Reprodução, Patrick, Jackie, Mari, Tiagão, Tilão, Xina, Guijerme e Dani pela ajuda nos experimentos, pela amizade e convivência, muito obrigado mesmo.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia, Dani, Zé, Tanaka, Nycolas, Santiago, Thais e Lindomar, também pelo companheirismo e amizade.

Aos professores e funcionários do CAUNESP que de alguma forma ajudaram para minha formação e para desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Seu Orandir e Profa. Dra. Laura do Laboratório de Morfologia pela ajuda nos cortes histológicos.

Ao Jacaré, Micha e Jeferson da Empresa Duke Energy por ceder a estrutura e os peixes que foram utilizados no experimento.

Finalmente, a todos os que de alguma maneira fizeram parte deste processo, muito obrigado.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

SUMÁRIO DE TABELAS	vii
SUMÁRIO DE FIGURAS	vii
REVISÃO DA LITERATURA.....	1
Consideração geral sobre a criação de peixes migradores nativos e suas características.....	1
A maturação final e ovulação em peixes e o papel das prostaglandinas	4
REFERÊNCIAS	8

CAPÍTULO II

RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
Peixes utilizados e tratamentos.....	16
Avaliação do desempenho reprodutivo	18
Análise descritiva e morfométrica dos ovários.....	19
Análise estatística	20
RESULTADOS	21
Peso total, comprimento total e índice gonadossomático (IGS).....	21
Porcentagem de fêmeas que desovaram	22
Desempenho reprodutivo	22
Histologia e frequência de ovócitos	23

Fertilização e percentual de desova em relação as horas-graus após a segunda dose	27
Desempenho reprodutivo entre diferentes desovas dentro da mesma estação reprodutiva.....	28
DISCUSSÃO.....	29
REFERÊNCIAS	33

SUMÁRIO DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Peso (kg) e comprimento total (cm) média \pm EP de pacus tratados com prostaglandina (T) e pacus controle (C), amostrados nas estações reprodutivas de 2009/2010 (1 – janeiro; 2 – fevereiro) e de 2010/2011 (3 – fevereiro).....	21
--	----

SUMÁRIO DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 - Porcentagem de desova (%) de pacus tratados com prostaglandina (T) e pacus controle (C), amostrados nas estações reprodutivas de 2009/2010 (1 – janeiro; 2 – fevereiro) e de 2010/2011 (3 – fevereiro).....	22
--	----

Figura 2 - Taxas de fecundidade, fertilização e eclosão de pacus tratados com prostaglandina $F_{2\alpha}$ (T) e pacus controles (C), amostrados nas estações reprodutivas de 2009/2010 (1 - janeiro/2 - fevereiro) e 2010/2011 (3 - fevereiro). As barras representam as médias dos dados coletados nas duas estações reprodutivas 2009/2010 (janeiro/fevereiro) e 2010/2011 (fevereiro).....	23
--	----

Figura 3 – (A) e (B) – Frequência de ovócitos (%) de pacus tratados com prostaglandina $F_{2\alpha}$ e pacus controle amostrados nas estações reprodutivas de 2009/2010 (A) (janeiro/fevereiro) e 2010/2011 (fevereiro) (B). PV- pré-vitelogênico; VNC – vitelogênico núcleo centralizado; VR – vitelogênico	
--	--

com GVBD, mas não ovulado; IM – imaturo; FPO – folículo pós-ovulatório; At – atrésico; TI – tecido intersticial.....24

Figura 4 -(A) e (B) – Foto micrografia dos ovários de pacu tratados com prostaglandina $F_{2\alpha}$ (A) e controle (B). Folículo pós-ovulatório (FPO), ovócito vitelogênico com GVBD, mas não ovulado (VR) pré-vitelogênico (PV) e vesícula germinativa (VG).....26

Figura 5 - Fertilização (%) e porcentagem de fêmeas que desovaram (%) em relação as horas graus de pacus tratados com prostaglandina $F_{2\alpha}$ e pacus controles amostrados nas estações reprodutivas de 2009/2010 [janeiro (coleta 1)/fevereiro (coleta 2) e 2010/2011 (fevereiro (coleta 3))]......27

Figura 6 – Taxas de fecundidade, fertilização e eclosão de pacus, amostrados na estação reprodutiva de 2009/2010 [janeiro (coleta 1) / fevereiro (coleta 2)]28

Capítulo I

REVISÃO DE LITERATURA

Consideração geral sobre a criação de peixes migradores nativos e suas características

A maioria dos peixes nativos com potencial zootécnico para a piscicultura é reofílica (Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007) e, no ambiente natural, necessitam migrar para as cabeceiras dos rios para se reproduzir (Rezende *et al.*, 1996; Alvarenga *et al.*, 2006; Honji, 2007; Godinho *et al.*, 2007). Quando essas espécies são mantidas sob condições de criação, ocorrem problemas no processo reprodutivo, provavelmente pela ausência de condições ambientais propícias, sobretudo temperatura, pluviosidade e fotoperíodo, além do estresse provocado pelo confinamento (Yaron, 1995; Zohar & Mylonas, 2001, Mylonas *et al.*, 2010). Mesmo assim, os migradores nativos estão no grupo de peixes que quando mantidos em cativeiro apresentam desenvolvimento ovocitário até a vitelogênese completa (Zohar & Mylonas, 2001). No entanto, a maturação final, ovulação e desova não ocorrem naturalmente, de modo que a utilização de hormônios exógenos é um modo efetivo para induzir este processo, bem como para propiciar o aumento do volume de sêmen nos machos (Donaldson & Hunter, 1983; Bromage, 1995; Mylonas *et al.*, 2010).

Dentre as espécies nativas migradoras com potencial zootécnico, podemos destacar o pacu, pertencente à superordem Ostariophysa, que inclui os peixes de maior valor comercial na pesca e na piscicultura brasileira. É da ordem Characiformes, um grupo dominante entre os

peixes de água doce da América do Sul, a qual está amplamente distribuída na região neotropical e apresenta o maior número de famílias. A subfamília Myleinae inclui esta espécie e é representada por peixes herbívoros, preferencialmente frugívoros. Dentre os gêneros, destaca-se o *Piaractus* e a espécie *Piaractus mesopotamcius* foco deste estudo (Urbinati *et al.*, 2010).

O pacu apresenta desova total e fecundação externa, a taxa de fecundidade varia entre 297.308 e 377.643 ovócitos quando mantido em cativeiro durante o 1º período reprodutivo (3º ano de vida) (Romagosa *et al.*, 1990). Sendo uma espécie reoflíca, só se reproduz em cativeiro por estimulação hormonal. O período de reprodução da espécie, nas diferentes regiões onde é produzido vai de outubro a março, tendo um pico entre novembro e janeiro, época de temperaturas mais altas e maiores índices pluviométricos (Urbinati *et al.*, 2010).

O método de hipofisacção foi desenvolvido na década de trinta, tendo como um dos seus principais precursores Rodolpho Von Ihering (Von Ihering & Azevedo, 1936). Esta técnica foi originalmente desenvolvida a partir da aplicação de hipófise de peixes maduros, a qual promove a retomada da meiose e a maturação final do ovócito (Von Ihering & Azevedo, 1936; Goetz, 1983, Nagahama & Yamashita, 2008, Mylonas *et al.*, 2010). A técnica de hipofisacção vem sendo a mais utilizada no Brasil e permitiu um avanço na produção aquícola das espécies nativas migradoras (Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007). No entanto, hoje em dia, sabe-se que o uso de extrato bruto de hipófise de carpa, assim como de outros hormônios (Hormônio liberador de gonadotrofina – GnRH e gonadotrofina coriônica humana – hCG) não promovem ovulação bem sucedida na totalidade das fêmeas injetadas. Na verdade, apesar de não relatadas cientificamente, observações de campo mostram uma grande variação no número de fêmeas que desovam após a indução hormonal, podendo até chegar a zero. Na ausência de desova, o abdômen torna-se intumescido e os ovócitos não ovulados formam

aglomerados na papila urogenital, popularmente descritos como “ovócitos empedrados”, e as fêmeas que não conseguem liberar os ovócitos frequentemente morrem logo após a indução hormonal.

No procedimento rotineiro de indução hormonal, as fêmeas recebem duas doses de hipófise (0,5 e 5,0 mg/ kg) com intervalo de dez a doze horas entre as doses (Cecarelli *et al.*, 2000). A eficácia deste método é comprovada em peixes reofílicos sul-americanos pertencentes às famílias Anostomidae, Curimatidae e Prochilodontidae (Sato *et al.*, 2000; Sampaio & Sato, 2007). Neste contexto, deve-se salientar que pesquisadores e produtores mais experientes utilizam diferentes concentrações e o intervalo de aplicação entre as doses, e há relato que as matrizes podem responder melhor com uma ou outra destas variações. Em alguns casos, o intervalo entre a primeira e a segunda dose é expandido para 24 ou até 31 horas (Brasil, 2001). No entanto, nenhuma destas variações é unanimidade entre produtores, e nem se comprovou que alguma delas tenha melhorado efetivamente e permanentemente o desempenho reprodutivo da espécie.

Outra proposta para minimizar os resultados desfavoráveis obtidos pela técnica de reprodução induzida é a aplicação de uma dose extra de hipófise (*priming* ou dose preparatória). Neste método, as matrizes recebem uma dose extra de hormônio (0,25 mg/kg) de 1 a 3 dias antes do tratamento convencional, e de acordo com os autores (Zaniboni Filho & Barbosa, 1996), o método melhora o desempenho reprodutivo. Existe, ainda, a combinação de diferentes hormônios, como o extrato de hipófise associado ao GnRH, hCG ou até mesmo a combinação de diferentes fontes de hipófise (Silva-Filho 1981; Peter *et al.*, 1988; Dumont-Neto *et al.*, 1997). No entanto, no caso do cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*, o uso de hCG associado à hipófise não promoveu resultados favoráveis (Leonardo *et al.*, 2004). Estes

dados avaliados de forma conjunta apontam para possíveis variações intra e inter-específicas das quais não se tem conhecimento científico em peixes migradores sul-americanos.

Desta forma, apesar das tentativas de variação do protocolo tradicional de hipofiseação (0,5 mg + 5,0mg/kg com intervalo de 12 horas), por método de “tentativa e erro“, a ovulação muitas vezes não é alcançada e os custos são altos. Apesar de não haver relatos científicos, observações de campo mostram que o número de fêmeas de pacu que ovula satisfatoriamente raramente atinge a totalidade do plantel; todavia como observado em nosso laboratório no curimatá, *Prochilodus lineatus*, o sucesso na desova da maioria das fêmeas é alcançado com maior frequência do que no pacu. Acrescenta-se a estes números as perdas até o momento da eclosão dos ovos, e durante o processo de larvicultura e alevinagem, e em geral morte de matrizes após a indução hormonal.

A maturação final e ovulação em peixes e o papel das prostaglandinas

A maturação final dos ovócitos é um pré-requisito para que ocorra a ovulação e envolve o processo de retomada da meiose ainda dentro dos ovários. Esta etapa ocorre normalmente algumas horas após a primeira indução hormonal, e é caracterizada por uma pequena hidratação dos ovócitos, principalmente pelo desencadeamento do processo de quebra da vesícula germinativa (ou núcleo) (Nagahama & Yamashita, 2008). Neste processo, a vesícula germinativa migra para a periferia do ovócito (ocorre o rompimento do envoltório nuclear), e perde o formato esférico regular e central que possuía antes do início deste processo (Guraya, 1986; Nagahama & Yamashita, 2008). Concluída a maturação final, inicia-se o processo de ovulação com a liberação dos ovócitos dos folículos ovarianos (Nagahama & Yamashita, 2008). A liberação dos ovócitos maduros (ovulação) envolve etapas: rompimento

das conexões entre os microvilos das células granulosas com os ovócitos, estreitamento e ruptura da parede folicular e ativação do processo de contração da musculatura lisa da parede folicular (Goetz, 1983). É sabido que a substância mais importante na estimulação dos processos de maturação final e ovulação é a 17α - 20β -diidroxí-4-pregnen-3-ona (DHP), um tipo de prostagênio conhecida como “hormônio indutor da maturação” (MIH) em peixes (Nagahama & Yamashita, 2008).

O DHP tem sua origem durante a maturação final dos ovócitos, quando células da camada teca produzem a 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP), que por sua vez atravessa a membrana basal do folículo e é convertida em DHP pela enzima 20β – hidroxíesteróide desidrogenase (20β -HSD) nas células granulosas. A ação da enzima 20β -HSD é por sua vez estimulada pelo hormônio luteinizante (LH) (Suzuki *et al.*, 1988; Nagahama, 1994), que possui receptores nos folículos ovarianos, os quais, quando estimulados, desencadeiam a síntese e liberação do DHP que atua diretamente nos ovócitos (Nagahama & Yamashita, 2008; Mylonas *et al.*, 2010).i

Neste contexto, Jalabert e colaboradores (1976) demonstraram que quando administrada em fêmeas de truta arco-íris *Salmo gairdneri* a DHP estimula a maturação final e ovulação. Por outro lado, no salmão coho *Oncorhynchus kisutch* (Jalabert *et al.*, 1978) e no “Northern pike” *Exous lucius* (Montalembert *et al.*, 1978) demonstrou-se que a administração apenas de DHP, antes da migração da vesícula germinativa, promovia a maturação final dos ovócitos, mas não a ovulação.

A eficácia do DHP em induzir o processo de maturação e desova também foi demonstrada *in vitro*, na perca amarela *Perca flavescens*, na qual a ovulação ocorreu após estimulação por $17\alpha,20\alpha$ – diidroxí-4-pregnen-3-ona ($17\alpha,20\beta$ – P) ($17\alpha,20\beta$ -P) (Goetz & Theofan, 1979) e DHP (Berndston *et al.*, 1989). Nagahama e colaboradores (1983)

demonstraram que, dentre diversos esteróides utilizados, a DHP é o mais eficaz na indução da maturação final em diversas espécies, tais como: o ayu *Plecoglossus altivelis*; salmão amargo *Oncorhynchus rhodurus*; e truta arco-íris *S. gairdneri* e o “goldfish” *Carassius auratus*. Por outro lado, em carpa comum, *Cyprinus carpio*, a administração somente de DHP foi completamente ineficaz, porém induziu a maturação final e ovulação quando as condições de temperatura eram extremas (altas) e após a administração de uma dose *priming* de hipófise (Jalabert *et al.*, 1977). Desta forma, a literatura indica que o efeito do DHP varia de acordo com a espécie e também de acordo com as condições experimentais.

Além do DHP, outros progestágenos são capazes de atuar na maturação e ovulação dos ovócitos de peixes, e outros esteróides também possuem esta capacidade: 17α - 20β ,21-triidroxi-4-prenen-3-ona (Nagahama, 1994); 17α , 20α -diidroxi-4-pregnen-3-ona (17α , 20β -P) e 17 , 21 -diidroxi-4-pregnen-3-ona (17 , 21 -P) (Canario & Scott, 1990); e a 20β -hidroxi-4-pregnen-3-ona (20 -P) (Moses & Haider, 1999). No entanto, indubitavelmente, a mais potente, inclusive confirmada por experimentos *in vitro*, é a DHP (Goetz & Theofan, 1979, Nagahama & Yamashita, 2008).

Por outro lado, não só o DHP, seus precursores e derivados são indutores da ovulação em peixes, mas outras substâncias também possuem papel importante no processo de maturação final e desova, entre as quais podemos destacar um grupo de hormônios conhecido como prostaglandinas. Estas substâncias, além de apresentarem um papel importante na indução do comportamento reprodutivo de espécies de peixes (Villars *et al.*, 1985; Munakata & Kobayashi, 2010) estão comprovadamente relacionadas com o processo de ovulação (Lister & Van der Kraak, 2008 e 2009). As prostaglandinas são eicosanóides produzidos a partir do ácido araquidônico (AA) e são muito eficientes na indução da ovulação em vários teleósteos (Ogata *et al.*, 1979; Cetta & Goetz, 1982; Goetz & Cetta, 1983; Jalabert & Szallosi, 1975).

Dentre os subtipos de prostaglandinas, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ é considerada a mais eficiente na indução à ovulação (Kagawa & Nagahama, 1981). Goetz e Cetta (1983) demonstraram em fêmeas maduras de *Salvelinus fontinalis* um aumento significativo nos níveis plasmáticos e ovarianos da $\text{PGF}_{2\alpha}$ relacionado à ovulação natural, quando comparado aos níveis da mesma substância em fêmeas maduras que não estavam desovando. Na *Perca flavescens*, foi demonstrado que o tratamento *in vitro* de folículos maduros com DHP induziu a produção de prostaglandinas E (PGE) e F (PGF) (Berndtson *et al.*, 1989), e que houve uma relação dose-dependente entre ovulação e os níveis de PGF e PGE (Bradley & Goetz, 1994). Na *Anguilla japonica*, estudo *in vitro* demonstrou que o DHP induziu a ovulação através da síntese de prostaglandinas endógenas nas camadas foliculares (Kagawa *et al.*, 2003).

Desta forma, apesar de ter sido demonstrada a relação entre as prostaglandinas e o processo de ovulação nos peixes, há uma grande escassez de informações sobre os mecanismos que controlam a síntese destas substâncias nos ovários (Lister & Van der Kraak, 2009). Recentemente, alguns estudos têm sido conduzidos em peixes menores e de mais fácil manejo como o zebrafish, *Brachydanio rerio* (Lister & Van der Kraak, 2008 e 2009). Nesta espécie, a inibição dos níveis de prostaglandinas com uso de indometacina diminuiu o número de ovócitos desovados (ovulação), o que sugere o papel das prostaglandinas no processo natural de maturação final e desova na espécie. De forma similar, os níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e DHP em fêmeas de *Brachydanio rerio*, em processo natural de desova, são significativamente maiores do que em fêmeas que não estão desovando (Lister & Van der Kraak, 2008). Ainda neste contexto, trabalhos recentes indicam que as gonadotropinas e os esteróides gonadais estão envolvidos com a regulação da via do AA nos folículos ovarianos (Lister & Van der Kraak, 2009).

Dado o elevado grau de conservação do processo meiótico e de ovulação entre vertebrados (Roelofs *et al.*, 2006; Espey, 1983), é razoável supor que, em peixes reofílicos, as prostaglandinas também estejam envolvidas no processo de ovulação, de modo que, como já verificado em outras espécies de peixes (Lister & van der Kraak, 2008 e 2009), é possível que este hormônio possa também potencializar o processo de desova em peixes reofílicos nativos, como o pacu.

Referências

- Alvarenga ER, Bazzoli N, Santos GB, Rizzo E. 2006. Reproductive biology and feeding of *Curimatella lepidura* (Eigenmann & Eigenmann) (Pisces, Curimatidae) in Juramento reservoir, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23 (2): 314-322.
- Brasil DF, 2001 Análise Estrutural e ultraestrutural da maturação final do ovócito, fertilização e primeira clivagem em curimatá, *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836. Tese apresentada ao Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista - CAUNESP, no Curso de Aqüicultura, área de concentração em Aqüicultura, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor. Jaboticabal –SP .
- Bromage N. 1995. Broodstock management and seed quality. In Bromage N. and Roberts RJ. (orgs.). Broodstock management and egg larval quality. Oxford: Blackwell Science, 424p.
- Bradley JA, Goetz FW. 1994. The inhibitory effects of indometachin nordihydroguaiaretic acid, and pyrrolidinedithiocarbamate on ovulation and prostaglandin synthesis in yellow perch (*Perca flavescens*) follicle incubates. *Prostaglandins*, 48: 11-20.
- Berndston AK, Goetz FW, Duman P. 1989. *In vitro* ovulation, prostaglandin synthesis, and proteolysis in isolated ovarian components of yellow perch (*Perca flavescens*): Effects of 17,20 β -diidroxi-4-pregnen-3-one and phorbol ester. *General and Comparative Endocrinology*, 75: 454-465.
- Canario, AVM, Scott, AP. 1990. Identification of and development of radioimmunoassays for 17,21 – dihidroxi-4-pregnen-3, 20-dione in the ovaries of mature plaice (*Pleuronectes platessa*). *General and Comparative Endocrinology*, 78:273-285.

- Ceccarelli PS, Senhorini JA, Volpato G. 2000. Dicas em piscicultura - perguntas e respostas. Botucatu: Ed. Santana, 247p.
- Cetta F, Goetz FW. 1982. Ovarian and Plasma Prostaglandin E and F Levels in Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) during Pituitary-Induced Ovulation. *Biology of Reproduction*, 27: 1216-1221.
- Donaldson EM, Hunter GM. 1983. Induced final maturation, ovulation, and spermiation. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM, editors. *Fish Physiology*. New York: Academic Press, 9: 351-403.
- Dumont-Neto R, Pelli A, Freitas RO, 1997. Reprodução induzida do dourado (*Salminus maxillosus*, Valenciennes, 1849) na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Volta- Grande. *Revista Unimar*, 19(2): 439-445.
- Espey LL, 1983. Comparison of the effect of nonsteroidal and steroidal antiinflammatory agents on prostaglandin production during ovulation in the rabbit. *Prostaglandins*, 26: 71-78.
- FAO – Fisheries Department. State of world aquaculture. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations. 145p. <http://www.fao.org> 2006 .
- Godinho AL, Kynard B, Godinho HP. 2007. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. *Environmental Biology and Fisheries*, 80: 421-433.
- Goetz FW, Theofan G. 1979. In vitro stimulation of germinal vesicle breakdown and ovulation of yellow perch (*Perca flavescens*) oocytes: Effects of 17,20 α – diidroxi-4-pregnen-3-one and prostaglandins. *General and Comparative Endocrinology*, 37: 273-285.
- Goetz FW. 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes; in *Fish Physiology*. (eds) Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (New York: Academic Press). Vol IXB, 117- 170.
- Goetz FW, Cetta F. 1983. Ovarian and plasma PGE and PGF in naturally ovulating brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the effects of indomethacin on prostaglandin levels. *Prostaglandins*. 26: 387-395.
- Guraya SS. 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. 18: P 1- 233 in Sauer HW, editor. *Monographs in Developmental Biology*. New York, Karger.

- Honji RM. 2007. Caracterização endócrina durante o ciclo reprodutivo da tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae), em três ambientes distintos: natural, impactado e cativo. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo.
- Jalabert B., Bry C., Brenton B., Campbell C., 1976. Action de la 17,20 β -diidroxi-4-pregnen-3-one et de la progestérone sur la maturation et l'ovulation in vivo et sur le niveau d'hormone gonadotrope plasmatique t-GTH chez la truite Arc-en-Ciel (*Salmo gairdneri*). C.R. Academic Science Paris, SérieD, 283: 1205-1208.
- Jalabert B, Brenton B, Brzuska E, Fostier A, Wieniawski J, 1977. A new tool for induced spawning: the use of 17,20 β -diidroxi-4-pregnen-3-one to spawn carp at low temperature. Aquaculture, 10: 353-364.
- Jalabert B, Goetz FW, Brenton B, Donaldson EM, 1978. Precocious induction of maturation and ovulation in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Journal of Fisheries Research Canada 35: 1423-1429.
- Jalabert B, Szollosi D. (1975). In vitro ovulation of trout oocytes: effect of prostaglandin on smooth muscle-like cells of the theca. Prostaglandins, 9: 765-779.
- Kagawa H, Nagahama Y. 1981. In vitro effects of prostaglandins on ovulation in goldfish *Carassius auratus*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 47: 1119-1121.
- Kagawa H, Tanaka H, Unuma T, Ohta H, Geen K, Ozukawa K. 2003. Role of prostaglandin in the control of ovulation in the Japanese eel *Anguilla japonica*. Fisheries Science, 69: 234-241.
- Leonardo AFG, Romagosa E, Borella MI, Batlouni SR. 2004. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). Aquaculture, 240: 451-461.
- Lister A, Van Der Kraak GJ. 2008. An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. General and Comparative Endocrinology, 159: 46-57.
- Lister A, Van Der Kraak GJ. 2009. Regulation of prostaglandin synthesis in ovaries of sexually-mature zebrafish (*Danio rerio*). Molecular Reproduction & Development, 76: 1064-1075.
- Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General and Comparative Endocrinology, 165: 516-534.

- Montalambert G, Jalabert B, Bry C. 1978. Problems with the precocious induction of maturation and ovulation in northern pike (*Esox lucius*). Annual of Biology Biochemistry and Biophysic, 18: 969-975.
- Moses R, Haider, S. 1999. Confirmation of maturation induced esterooids in a freshwater catfish, *Clarias batrachus*, 6° International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Bergen, July 4-5.
- Munakata A, Kobayashi M. 2010. Endocrine control of sexual behavior in teleoste fish. General and Comparative Endocrinology, 165: 456-468.
- Nagahama Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. International Journal of Development Biology, 38: 217-229.
- Nagahama Y, Yamashita M. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. Development Growth Differentiation, 50: 195-219.
- Nagahama Y, Hirose K, Young G, Adachi S, Suzuki K, Tamaoki B (1983). Relative in vitro effectiveness of 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and other pregnene derivatives on germinal vesicle breakdown in oocytes of ayu (*Plecoglossus altivelis*), amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*), rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and goldfish (*Carassius auratus*). General and Comparative Endocrinology, 51:15-23.
- Ogata H, Nomura T, Hata M. (1979). Prostaglandin F₂ alfa changes induced by ovulatory stimuli in the pond loach, *Misgurnus anguilicaudatus*. Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries, 45: 929-931.
- Peter RE, Lin HR, Van Der Kraak G. 1988. Induced ovulation and spawnig of culture freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonist. Aquaculture, 74: 1-10.
- Rezende APS, Alves CBM, Silva MOB, Mello CBM. 1996. Avaliação da maturação gonadal e indução da reprodução de peixes coletados no Rio Grande, a jusante da UHE, Itutinga, MG. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootécnica, 48: 39-46.
- Roelofs JB, Graat EAM, Mullaart E, Soede NM, Voskamp-Harkema W, Kemp B. 2006. Effects of insemination–ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. Theriogenology, 66: 2173–2181.
- Romagosa E, Paiva P, Godinho HM, Guilherme E. 1990. Fecundidade do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), mantido em confinamento, durante o 1° e 2° período reprodutivo. Boletim do Instituto de Pesca, 17: 99-103.

- Sampaio EV, Sato Y. 2007. Desova induzida e aspectos reprodutivos de *Curimatella lepidura* (Eig. & Eig., 1889) (Osteichthyes, Characiformes), espécie endêmica da bacia do rio São Francisco. *Revista Brasileira de Zoociências*, 9 (2): 135- 142.
- Sato Y, Fenerich-Verani N, Verani JR, Vieira LJS, Godinho HP. 2000. Induced reproductive responses of the neotropical anostomid fish *Leporinus elongatus* Val. under captive breeding. *Aquaculture Research*, 31: 189-193.
- Silva Filho JA. 1981. Contribuição ao estudo da reprodução induzida da piapara *Leporinus obtusidens*, em cativeiro com uso da hipófise fresca da piava catinguda, *Schizodon fasciatus*, e Pregnyl. In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca. Recife Anais, 2: 179-185.
- Suzuki, K, Nagaham, Y e Kawauchi, H. 1988. Steroidogenic activities of two distinct salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biology of Reproduction*, 44: 29-38.
- Urbinati EC, Goncalves FD, Takahashi LS. Pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: Bernardo Baldisseroto; Levy de Carvalho Gomes. (Org.). *Espécies Nativas para piscicultura no Brasil*. 2 ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2010, 1-606p.
- Von Ihering R, Azevedo P. 1936. A desova e a hipofiseação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. *Archivos do Instituto de Biologia*, 7: 107-18.
- Villars TA, Hale N, Chapnick D. 1985. Prostaglandin- $F_{2\alpha}$ stimulates reproductive behavior of female paradise fish (*Macropodus opercularis*). *Hormones and Behavior*, 19: 21-35.
- Yaron Z. 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, 129:49-73.
- Zaniboni Filho E, Barbosa NDC. 1996. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. *Revista Brasileira de Biologia*, 56: 655-659.
- Zaniboni-Filho E, Weingartner M. 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores (Induced breeding in migratory fishes). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte, 31, (n.3): 367-373.
- Zohar Y, Mylonas CC. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99-136.

Ovulação de matrizes de pacu *Piaractus mesopotamcius* e o papel da prostaglandina F_{2α}

Resumo

Os relatos de produtores e pesquisadores sobre problemas na fase de ovulação do pacu *Piaractus mesopotamicus* durante a reprodução artificial nos conduziu a avaliar o uso da prostaglandina F_{2α}. O estudo foi realizado em duas estações reprodutivas (2009/2010 e 2010/2011), com dois experimentos na estação 2009/2010 (T1 e T2) um experimento na estação 2010/2011 (T3). Foi amostrado um total de 45 fêmeas. As fêmeas do grupo controle foram induzidas apenas com extrato bruto de hipófise de carpa (EC, 6mg/kg), enquanto as do grupo tratado receberam prostaglandina F_{2α} (PGF - 2ml/fêmea na estação 2009/2010 e 5ml/fêmea na estação 2010/2011), além da dose de EC. Nas duas estações observou-se 100% de fêmeas desovadas no grupo tratado com PGF enquanto no grupo controle a desova ocorreu em 52,94% e 83,33% no primeiro e segundo experimentos da estação 2009/2010, respectivamente. Em 2010/2011, somente 25% das fêmeas controle desovaram. As taxas de fecundidade, fertilização e eclosão não diferiram ($p>0,05$) entre os grupos de fêmeas. A análise da frequência de volume de ovócitos nas diferentes fases de desenvolvimento mostrou, nos ovários analisados pós-desova, valores significativamente maiores ($p<0,05$) de ovócitos vitelogênicos com quebra de vesícula germinativa, mas não ovulados no grupo controle e maior ocorrência de ovócitos pré-vitelogênicos no grupo tratado com PGF. Independente do tratamento, as maiores taxas de fertilidade ocorreram ao redor de 275 UTA, enquanto a maior parte das fêmeas desovou entre 276 e 323 UTA. Do mesmo modo, independente do tratamento, houve um decréscimo significativo ($p<0,05$) nas taxas de fertilização e eclosão na comparação das duas coletas de 2009/2010. Os dados obtidos neste estudo sugerem que a prostaglandina pode aumentar as taxas de desova em fêmeas de pacu induzidas à reprodução, com efeito evidente na liberação dos ovócitos dos folículos.

Palavras chave: Pacu, ovulação, prostaglandinas, folículo ovariano

Abstract

Due to reports of fish farmers and researchers about the problems in the ovulation phase of *P. mesopotamicus* during its artificial reproduction we evaluated the use of prostaglandin F. The study was conducted in two spawning seasons (2009/2010 and 2010/2011), with two samplings in season 2009/2010 and one sampling in 2010/2011. Forty five females broodstock were sampled. Control group was injected with carp pituitary extract (CE, 6mg/kg), while treated group received prostaglandin F (PGF – 2ml/ 2009/2010 season and 5ml/2010/2011 season) in addition to CE. In the two seasons 100% of treated with PGF groups spawned while in control groups 52,94% and 83,33% in first and second sampling of season 2009/2010 spawned, respectively. In 2010/2011 only 25% of control group spawned. Fecundity, fertility and hatching rates did not differ ($p>0.05$) between groups. The oocytes volume frequency analysis showed that in ovaries after spawning, in control group, there was a significant higher number ($p<0.05$) of vitelogenic oocytes with GVBD but anovulated, while in PGF treated group, a higher number ($p<0.05$) of pre-vitelogenic oocytes was observed. Independent on the treatment, the highest fertility rate occurred around 275 ATU, while most of the females spawned in a range of 276 and 323 ATU. The same way, independent on the treatment, there was a significant decrease ($p<0.05$) in fertility and hatching rates comparing samplings from 2009/2010. Data obtained in this study suggest that prostaglandin F might enhance spawning rate in hormonal induced females of pacu, with a notable effect on the release of oocytes from the follicles.

Keywords: Pacu; Prostaglandins; Ovulation; Ovarian follicles

Capítulo II

Introdução

A reprodução em condições de criação é o alicerce da produção de qualquer peixe, especialmente no caso dos reofílicos, que precisam ser hormonalmente induzidos. No entanto, hoje em dia, não é raro se deparar com relatos de piscicultores e pesquisadores sobre matrizes que não respondem adequadamente a tratamentos hormonais, perda de matrizes após a indução hormonal, baixa sobrevivência de ovos e larvas, má-formação de larvas, e outras dificuldades que acometem diretamente o processo reprodutivo e a viabilização da produção destas espécies. O pacu é uma espécie migradora, com alto valor comercial, hábito alimentar herbívoro/frugívoro e possui uma grande produção no Brasil, principalmente na região sudeste (Abimorad et al., 2008; Jomori et al., 2008). De acordo com o Ministério da Pesca e Aquicultura (2010) sua produção aumentou de 12,397 toneladas em 2007 para 15,189 e 18,171 em 2008 e 2009, respectivamente. É uma espécie com desova total que depende exclusivamente de indução hormonal para desovar em condições de criação (Urbinati et al., 2010). O período reprodutivo vai de outubro a março (primavera/verão), com um pico entre novembro e janeiro, período com as maiores temperaturas e maiores índices pluviométricos (Urbinati et al., 2010). Um dos problemas cada vez mais recorrente na reprodução artificial do pacu é o insucesso na ovulação que resulta na não liberação dos ovócitos dos folículos ovarianos nas matrizes hipofisadas. Fenômeno popularmente conhecido como “empedramento”, pelo fato dos ovócitos acumularem-se próximos à papila e não serem liberados.

De acordo com Heinfellner et al. (2011), este fato pode estar relacionado a falha no processo de ovulação, uma vez que, em fêmeas de matrinxã (*Brycon amazonicus*) que

apresentaram este empedramento, os ovócitos passaram pelo processo de maturação final (quebra da vesícula germinativa) mas não foram eliminados dos folículos, permanecendo aderidos ao estroma, dando aos ovários o caráter de “empedrado”.

O processo de ovulação resulta na liberação dos ovócitos dos folículos ovarianos (Nagahama & Yamashita, 2008). Existem substâncias que atuam na maturação final e ovulação de peixes como: $17\alpha - 20\beta$ -diidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP) (Nagahama & Yamashita, 2008); $17\alpha - 20\beta,21$ – triidroxi-4-prenen-3-ona (Nagahama, 1994); $17,21$ -diidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,21 - P$) (Canario & Scott, 1990) e a 20β -hidroxi-4-pregnen-3-ona ($20 - P$) (Moses & Haider, 1999), além de um grupo de substâncias conhecidas como prostaglandinas que além de apresentarem um papel importante na indução do comportamento reprodutivo de diversas espécies de peixes (Villars *et al.*, 1985; Munakata & Kobayashi, 2010) estão comprovadamente relacionadas com o processo de ovulação (Lister & Van der Kraak, 2008 e 2009).

Dentro deste contexto, objetivou-se avaliar a possibilidade de potencializar a ovulação do *P. mesopotamicus* por meio da administração de prostaglandina $F_{2\alpha}$ sintética associada ao agente indutor (hipófise) à reprodução.

MATERIAL E MÉTODOS

Peixes utilizados e tratamentos

Neste experimento foram utilizadas quarenta e cinco fêmeas de pacu de criação com idade entre três e quatro anos mantidas na Estação Experimental de Piscicultura da Empresa *Duke Energy*, localizada em Salto Grande – SP, Brasil ($22^{\circ}54'23.81''S$ e $50^{\circ} 00' 05.06''O$). Os peixes permaneceram em viveiros escavados em terra ($200m^3$), em uma densidade de 0,25

peixes por m³ abastecidos com água do Rio Paranapanema, SP, e alimentados com ração comercial (28% proteína bruta (min.); 10% extrato etéreo (min.); 5% matéria fibrosa (max.); 7% de cinza (max.) 10% cálcio (max.), 1,2% fósforo (min.) 0,6%) fornecida uma vez ao dia (16 h) , correspondendo a 3% de biomassa. Os parâmetros de qualidade de água observados durante o período experimental (três semanas) foram: temperatura 26,5 ±1,20 °C, oxigênio dissolvido 5,4 ± 0,44 mg/l e pH a 6,9 ± 0,10.

Nas duas estações reprodutivas (2009/2010 e 2010/2011), os peixes foram inspecionados periodicamente nos viveiros durante o período reprodutivo (outubro a março). As matrizes foram selecionadas aleatoriamente quando consideradas aptas para reprodução, de acordo com as características externas: ventre abaulado, macio e papila urogenital saliente; e nos machos a fluidez de sêmen por meio de massagem abdominal, realizada no sentido antero-posterior.

Fêmeas e machos maduros foram selecionados nos meses de janeiro e fevereiro, com peso médio de 1,8kg ± 2,2 e comprimento médio de 44,47cm ± 1,44 (Tabela 1). Após a seleção foram transportados para o laboratório em caixas próprias para transporte e acondicionados em aquários (quatro peixes por aquário, machos e fêmeas foram mantidos separados) com capacidade para 500 l de água, também abastecidas com água do Rio Paranapanema, SP. Os peixes foram então divididos em dois grupos (controle e tratados com prostaglandina) e ambos receberam duas doses de extrato bruto de hipófise de carpa EC (0,6 e 5,4 mg/kg, com intervalo de 24 horas entre as doses). O grupo tratado recebeu uma dose de prostaglandina F sintética (Ciosin/Schering-Plough®) no momento da segunda dose de EC.

Na estação reprodutiva de 2009/2010, o grupo tratado recebeu 2mL de prostaglandina por fêmea. Nesta estação, foram realizadas duas desovas, uma no dia 28/01/2010 (tratado 1 (T1) e controle (C1)) e outra no dia 12/02/2010 (tratado 2 (T2) e controle 2 (C2)).Na segunda

estação reprodutiva 2010/2011, foi realizada uma única desova (tratado 3 (T3) e controle 3 (C3) devido a disponibilidade do plantel local. A dose de prostaglandina utilizada foi de 5mL por fêmea.

Os machos utilizados foram induzidos com hipófise e receberam apenas uma dose na concentração de 1,5 ml/kg no mesmo momento que as fêmeas receberam a 2° dose.

Avaliação do desempenho reprodutivo

Na estação reprodutiva de 2009/2010, a 2° dose de EC foi aplicada às 22:00 h e a extrusão das fêmeas foi realizada no dia seguinte, pela manhã, 210 horas-grau após a segunda dose. Já na estação reprodutiva de 2010/2011, a 2° dose de EC foi aplicada às 06:40 h e as fêmeas extrusadas no período da tarde, 210 horas-grau após a 2° dose. Após a extrusão, foi calculado o percentual de fêmeas que desovaram (n° total de fêmeas desovadas/ n° total de fêmeas*100) e registrado o horário da desova (1° desova - 2009/2010: tratados n=4/ controles n=17; 2° desova - 2009/2010: tratados n=5/ controles n=12; 3° desova - 2010/2011: tratados n=3 / controles n=4).

O número total de ovócitos liberados de cada fêmea foi estimado, e para isso, logo após a extrusão e antes da fertilização, a massa total de ovócitos liberado por cada fêmea foi registrada e amostras de ~1g foram coletadas para a contagem (4 réplicas). A fecundidade relativa (n° de ovócitos liberados por grama de peixe) também foi estimada através do n° total de ovócitos/quilograma de cada fêmea *100.

Depois de registrado o peso, os ovócitos foram fertilizados por um *pool* de sêmen de machos do mesmo lote (em média quatro machos por desova). Este procedimento foi realizado para evitar a influência de outros fatores além da influência das fêmeas durante o processo de reprodução artificial. Os machos utilizados para os dois grupos (controle e

tratado) foram os mesmos. Aproximadamente 0,5ml de sêmen foi utilizado para fertilizar 50g de ovócitos.

Foram também estimadas as taxas de fertilidade (percentual de ovócitos fertilizados 8 horas após a fecundação) e eclosão (percentual de larvas-eclodidas 18h após da fecundação) (n=45). As taxas de fertilidade e eclosão foram estimadas contando-se os embriões e ovos gorados, em quatro amostras de 1 mL, de cada incubadora, oito e dezoito horas pós-fertilização, respectivamente. Foram utilizadas três incubadoras para cada fêmea, e em cada incubadora foram colocadas em média 200mL de ovócitos. As incubadoras utilizadas eram do tipo “Israel” de 7 L com fluxo de 5 L por minuto.

Análise descritiva e morfométrica dos ovários

Imediatamente após a desova, fêmeas controles e tratadas que desovaram foram aleatoriamente capturadas (Tabela 1), e eutanasiadas com aprofundamento no plano anestésico para coleta dos dados biométricos e amostras biológicas. Nestas fêmeas, imediatamente após a desova, amostras dos ovários das regiões cranial, média e caudal foram fixadas em Solução de Bouin para o processamento histológico de rotina. As amostras foram incluídas em historesina para obtenção de cortes histológicos e coradas em hematoxilina-floxina (Gurr,1971).

Primeiramente, foi realizada uma avaliação descritiva destacando-se as características dos ovários e ovócitos de cada fêmea analisada. Após esta análise, foi realizada também uma análise morfométrica dos ovários para determinação da frequência de ovócitos nas distintas fases de desenvolvimento e foram classificados como: pré-vitelogênicos (PV); alvéolos corticais (AC); atrésicos (AT) e vitelogênicos. Três tipos de ovócitos vitelogênicos foram encontrados: os imaturos (IM) que ainda não apresentavam vitelogênese completa, com

citoplasma ainda não preenchido totalmente por vitelo; os maduros sem quebra de vesícula germinativa (GVBD) apresentando núcleo central (VNC); e os vitelogênicos com GVBD, mas que não ovularam, e permaneceram aderidos aos ovários (VR). Foram considerados também os folículos pós-ovulatórios (FPO) e tecido intersticial (TI).

As contagens compararam a frequência de volume ocupada pelos distintos tipos de ovócitos e folículos pós-ovulatórios nos diferentes tratamentos. Para cada peixe, foram utilizados quatro campos microscópicos (objetiva 4x) de cada região dos ovários (anterior, média e posterior) (12 campos microscópicos por ovário). As contagens foram feitas em um grid com 352 pontos. Foram computados os pontos sobre as distintas estruturas mencionadas no parágrafo anterior e calculadas suas frequências ($n^\circ \text{ pontos} * 100 / \text{total de pontos}$). O método utilizado para contagem foi o mesmo usado por Alvarenga & França (2009) com algumas modificações. Na estação reprodutiva de 2009/2010 os peixes das duas desovas realizadas foram agrupados para estas análises, uma vez que a dose de prostaglandina não variou entre as mesmas.

Análise Estatística

A normalidade e homocedasticidade foram encontradas para os valores das taxas de fecundidade, fertilização, eclosão e foram analisados pelo teste t de *Student* ($\alpha=5\%$) comparando os grupos controle e tratado nas desovas 1 e 2 (estação reprodutiva 2009/2010). Entretanto os parâmetros de frequência de células ovarianas foram realizados pela análise não-paramétrica do teste U de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$) para as desovas 1 e 2 (estação reprodutiva 2009/2010), comparando-se os dois grupos tratado e controle. A análise estatística foi realizada pelo programa Statistic 7.0 (STATSOFT, 2004). Os dados estão representados pelas médias seguida pelo erro-padrão.

Resultados

Peso e comprimento total

De acordo com a Tabela 1, que apresenta os valores médios de peso, comprimento total e índice-gonadossomático (IGS) dos peixes controle e dos peixes tratados com prostaglandina utilizados nas três desovas (C1, T1, C2, T2, C3, T3), não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos, sugerindo que estas variáveis não afetaram os resultados obtidos no experimento.

Tabela 1 – Valores médios de peso (kg), comprimento total (cm), índice gonadossomático (IGS), N (número total de peixes) média \pm EP (erro padrão) de *P. mesopotamicus* controle (C) e tratados com prostaglandina (T), amostrados nas estações reprodutivas de 2009/2010 (1 – janeiro; 2 – fevereiro) e de 2010/2011 (3 – fevereiro).

	Variáveis				
	Peso(kg)	Comprimento(cm)	IGS(%)	N _(total)	N _(desovadas)
C1	1,95 \pm 0,18	44,29 \pm 1,17	18,92 \pm 4,97	17	8
T1	1,94 \pm 0,14	45,20 \pm 0,34	16,71 \pm 3,19	4	4
C2	2,00 \pm 0,10	45,78 \pm 0,62	18,33 \pm 4,66	12	9
T2	1,80 \pm 0,24	44,64 \pm 1,67	23,17 \pm 4,28	5	5
C3	1,40 \pm 0,00	41,30 \pm 0,00	17,89 \pm 5,05	4	1
T3	1,50 \pm 0,44	42,47 \pm 3,41	14,99 \pm 4,59	3	3
				45	30

Porcentagem de fêmeas que desovaram

Na 1° e 2° desovas da estação reprodutiva de 2009/ 2010, 100% dos peixes tratados com prostaglandina desovaram, enquanto que apenas 52,94 e 83,33% dos peixes controle desovaram respectivamente nos mesmos períodos. Na estação reprodutiva de 2010/2011, 25 e 100% dos peixes controle e tratados desovaram, respectivamente (Figura 1).

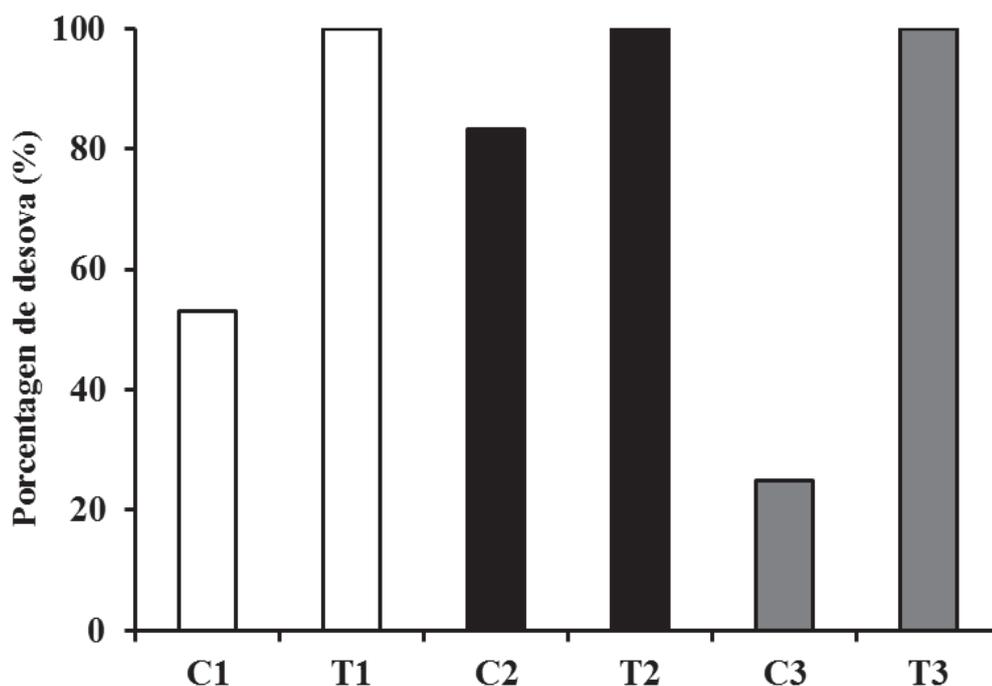


Figura 1 – Porcentagem de desova (%) de *P. mesopotamicus* controle (C) e tratados com prostaglandina (T), amostrados nas estações reprodutivas de 2009/2010 (1 – janeiro; 2 – fevereiro) e de 2010/2011 (3 – fevereiro).

Desempenho reprodutivo

Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as taxas de fecundidade, fertilização e eclosão comparando os resultados dos grupos controle e os tratados com prostaglandina dentro da mesma desova (Figura 2).

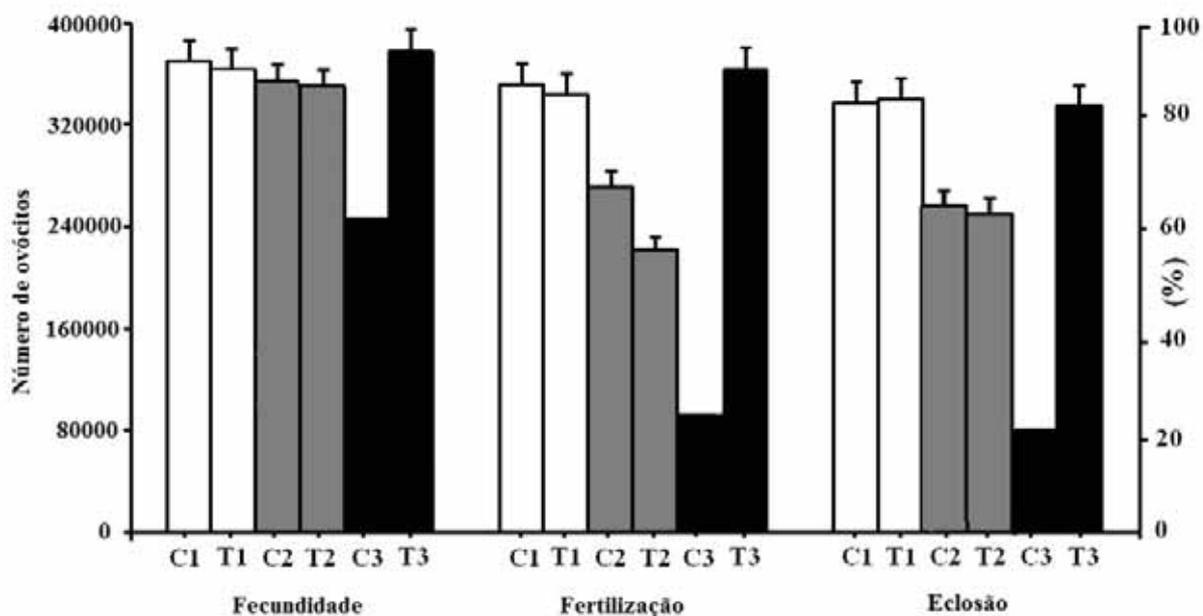
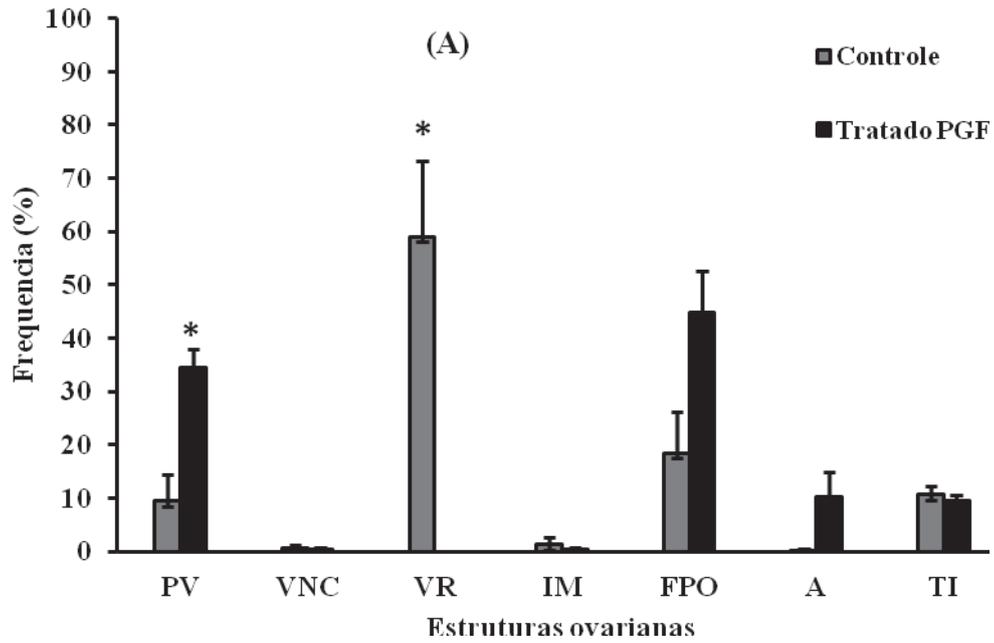


Figura 2 – Taxas de fecundidade, fertilização e eclosão de *P. mesopotamicus* controles (C) e tratados com prostaglandina F (T) amostrados nas estações reprodutivas de 2009/2010 (1 - janeiro/2 - fevereiro) e 2010/2011 (3 - fevereiro). As taxas de fecundidade estão relacionadas no gráfico com o eixo Y e as taxas de fertilização e eclosão com o eixo Z. As barras estão representadas pela média seguida de EP

Histologia e frequência de ovócitos

Na estação reprodutiva de 2010/2011 (Figura 3(B)), foi realizado o mesmo processo de contagens do que nos outros períodos, porém não foi possível aplicar nenhum teste estatístico pois, apenas uma fêmea controle (de quatro injetadas) desovou. Sendo assim, foi realizada somente uma análise descritiva da frequência de volume dos ovócitos. Nos animais tratados com 2mL de prostaglandina, a frequência de PV remanescentes nos ovários após a desova foi significativamente superior à dos controles ($p < 0,05$) (Figura 3A). Padrão semelhante foi encontrado no tratamento com 5 mL (Figura 3B). As frequências de VNC, IM, A e TI não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 3A). Ao analisar os VR, ou seja, com GVBD, mas não-ovulados, observou-se que a frequência foi significativamente menor ($p < 0,05$) nos peixes tratados ($n=4$; 21%) com 2 mL de prostaglandina do que os respectivos controles ($n=3$; 34%). Os valores médios deste tipo de ovócito nos animais tratados com 5 mL de prostaglandina foi numericamente inferior ao valor encontrado para o respectivo controle (~50% menos). Os animais tratados com 2 e 5mL de prostaglandina apresentaram frequências de FPO ~2 e ~3

vezes maiores do que seus respectivos controles, mas não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). A figura 4 mostra ovários de fêmeas de pacu tratadas com prostaglandina F (A) e controle (B), evidenciando os folículos pós-ovulatórios (FPO), ovócitos vitelogênicos com GVBD, mas não ovulados (VR) e pré-vitelogênicos (PV).



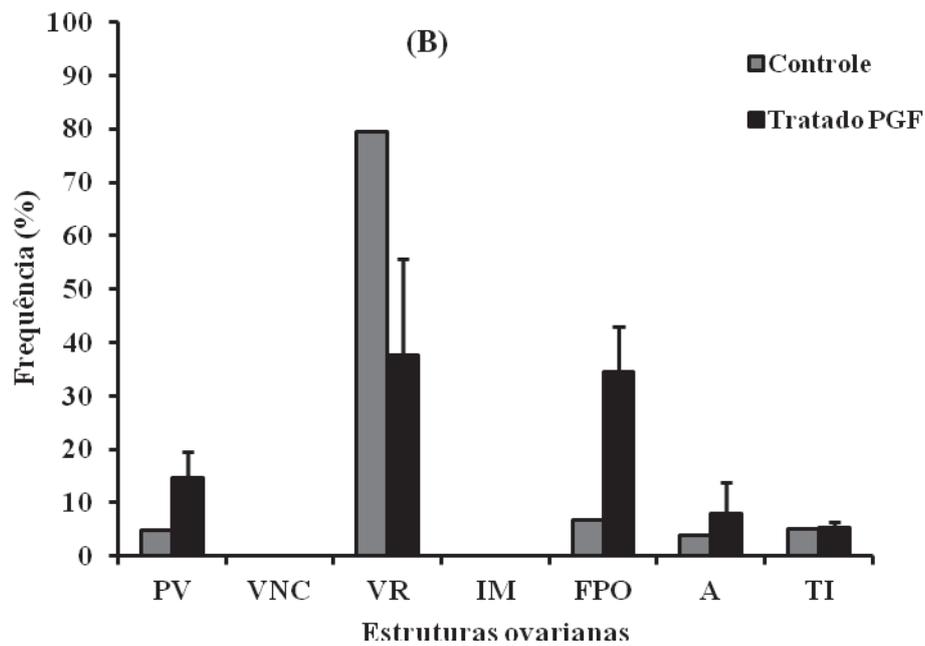


Figura 3 (A) e (B) – Frequência dos ovócitos (%) de *P. mesopotamicus* controle e tratados com prostaglandina amostrados nas estações reprodutivas de 2009/2010 (A) (janeiro/fevereiro) (2ml PG) e 2010/2011 (fevereiro) (5ml PG) (B). PV- pré-vitelogênico; VNC – vitelogênico núcleo centralizado; VR – vitelogênico com GVBD, mas não ovulou; IM – imaturo; FPO – folículo pós-ovulatório; A – atresico; TI – tecido intersticial. Diferenças estatísticas entre grupo controle e tratado estão demonstradas por asterisco.

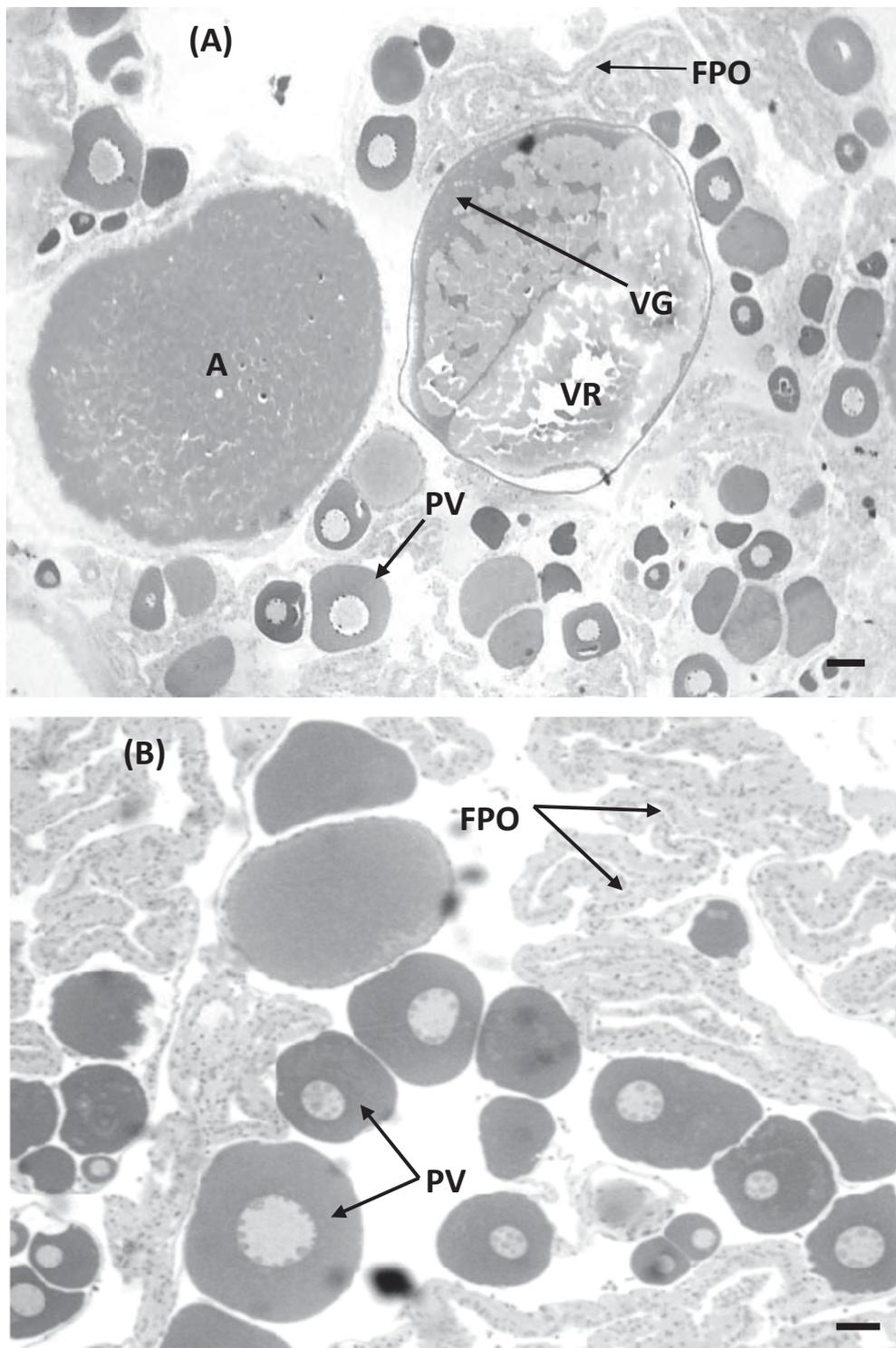


Figura 4 – (A) e (B) – Foto micrografia dos ovário de *P. mesopotamicus* controle (A) e tratado com prostaglandina F (B). Folículo pós-ovulatório (FPO), ovócito vitelogênico com GVBD, mas não ovulados (VR) pré-vitelogênico (PV) e vesícula germinativa(GV). (Hematoxilina-floxina). Barra=10µM

Fertilização e percentual de desova em relação às horas- grau após a 2ª dose hormonal

Neste estudo, pudemos comparar também os resultados obtidos, independentemente de tratamento, entre as desovas. Para isto, todas as fêmeas (controles e tratados) de uma mesma desova foram agrupadas e seus índices (fertilidade e taxa de desova) analisados de forma conjunta para se ter conhecimento do efeito de cada desova sobre os parâmetros encontrados.

Com relação ao registro de unidades térmicas acumuladas (horas-grau), verificou-se que nas duas primeiras desovas (2009/2010) a maioria das fêmeas desovou entre 300 e 323 UTA, enquanto que na 3ª desova (2010/2011) a maior parte das fêmeas desovou entre 276 e 299 UTA. No entanto, as maiores taxas de fertilidade para as três coletas foram encontradas para as fêmeas que desovam antes, com 275 UTA, e as menores taxas para as fêmeas que desovaram posteriormente com 324 UTA (Figura 5).

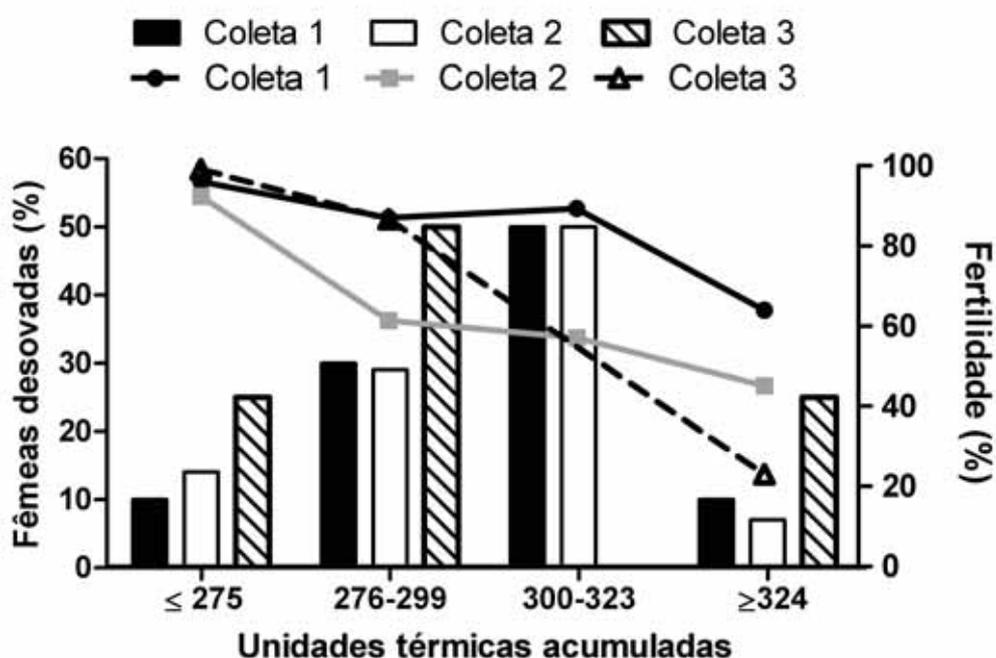


Figura 5 – Fertilização (%) (linhas) e porcentagem de fêmeas que desovaram (%) (barras) em relação as horas- grau de *P. mesopotamicus* amostrados nas estações reprodutivas de 2009/2010 (janeiro (coleta 1)/fevereiro (coleta 2)) e

Desempenho reprodutivo entre as desovas dentro da mesma estação reprodutiva

Independentemente dos tratamentos, detectamos um decréscimo significativo ($p < 0,05$) nos valores das taxas de fertilização e eclosão quando comparamos as duas coletas (janeiro/fevereiro) de 2009/2010 (agrupando os tratados com PG e controles de cada coleta) (Figura 6).

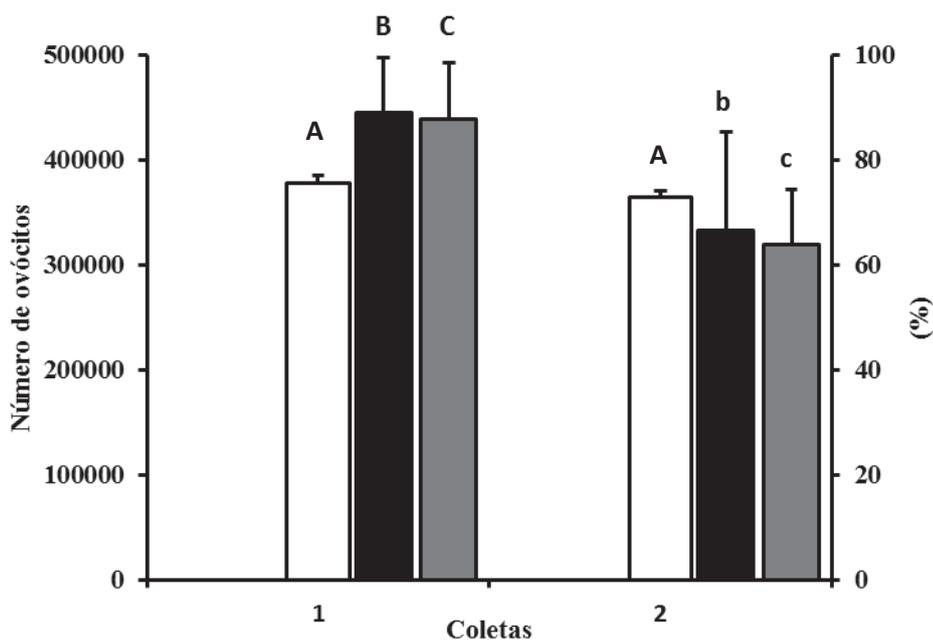


Figura 6– Valores das taxas de fecundidade (branco), fertilização (preto) e eclosão (cinza) de pacus, amostrados na estação reprodutiva de 2009/2010 (janeiro (coleta 1) / fevereiro (coleta 2)). As taxas de fecundidade estão relacionadas no gráfico com o eixo Y e as taxas de fertilização e eclosão com o eixo Z. Valores estão representados pela média seguida de EP.

Discussão

O uso de prostaglandina F sintética (PGF) (Ciosin/Schering-Plough®) neste estudo foi uma ferramenta eficaz para otimizar o desempenho reprodutivo do pacu. Além disso, os resultados sugeriram que o mecanismo de ação da substância associa-se com o ponto mais falho na desova desta espécie: a ovulação.

Os resultados obtidos mostraram que a taxa de desova foi constante ao longo das três desovas nos animais tratados com PG, além disso, 100% dos animais tratados desovaram. Por outro lado, nos controles, a variação na taxa de desova foi ampla, de 25% a ~84%. Além do que, as análises morfométricas revelaram precisamente o efeito da prostaglandina no processo ovulatório, intensificando-o nas fêmeas tratadas. Neste estudo o uso da PG reduziu significativamente o número de ovócitos remanescente nos ovários que apresentavam GVBD mas que não ovularam (VR), estes dados corroboram com estudo recente em *Brycon amazonicus*, no qual fêmeas que não desovaram apresentaram uma porcentagem maior de ovócitos com VR do que as fêmeas que ovularam (Heinfellner, 2011). Assim, podemos afirmar seguramente que uma falha no processo ovulatório está relacionado com a ausência da desova em peixes tropicais com desova total. Desta forma, o uso de PG pode ajudar a solucionar um dos principais problemas na reprodução desta espécie que é a insegurança e a incapacidade de prever se as fêmeas desovarão ou não após o tratamento hormonal.

O papel das prostaglandinas no processo ovulatório de peixes migradores com desova total é completamente desconhecido, a maioria dos estudos são conduzidos em peixes modelos ou se referem a estudos *in vitro* utilizando espécies de regiões temperadas. Neste contexto, sabe-se que a PG é um dos principais hormônios que atuam na ovulação dos peixes e na expulsão dos ovócitos de dentro dos folículos (Lister & Van der Kraak, 2008 e 2009). Stacey & Pandey (1975) foram os primeiros pesquisadores a descrever, no “goldfish” *Carassius auratus*, que a ovulação induzida *in vivo* por meio de gonadotrofina coriônica humana (hCG) podia ser bloqueada pela indometacina, um inibidor da atividade da enzima cicloxigenase que atua na síntese de PG, e logo após restaurada pela utilização de PG exógena. Em estudo posterior, as PGs F_{2α}, E₁, e E₂ induziram a ovulação na perca-amarela *Perca flavescens* em folículos bloqueados por indometacina (Goetz & Theofan, 1979). Resultados similares foram obtidos com *Brachydanio rerio*, no qual a inibição dos níveis de PG pelo uso da indometacina gerou uma redução no número de ovócitos desovados (Lister &

Van der Kraak, 2008). No pacu uma redução no número de ovócitos VR retidos nos ovários pós-desova, sugerem que o papel desta substância esta relacionada com o processo de ovulação, mas estudos posteriores, *in vitro*, podem esclarecer se a prostaglandina esta também relacionada com o processo de maturação final (GVBD).

Neste estudo, não foi encontrado efeito dose-dependente desta substância, uma vez que quando foi usado 5mL de PG (terceira desova) apenas um controle desovou, e não foi possível analisar estatisticamente os dados de desova e histomorfométricos. De qualquer forma, com relação a taxa de desova e com os demais parâmetros reprodutivos avaliados neste trabalho, não foram encontrados indícios de uma relação entre os resultados e a dose injetada.

Como dito anteriormente, a PG desempenha um papel importante na ovulação de peixes teleósteos (Stacey & Pandey, 1975; Goetz et al., 1982; Lister & Van der Kraak, 2008 e 2009), na indução do comportamento reprodutivo (Villars *et al.*, 1985; Munakata & Kobayashi, 2010) e parece estimular a maturação final em algumas espécies de peixes (Sorbera et al., 2001; Patiño et al., 2003; Lister & Van der Kraak, 2008), mas não há dados científicos demonstrando que o uso deste hormônio pode reduzir as taxas de fertilidade de peixes ou causar malformações de larvas. Neste estudo, o uso de PG não afetou os valores das taxas de fertilidade (média das três desovas 77,61%) e eclosão (média das três desovas 69,77) entre os peixes tratados e controle da mesma coleta. Guerreiro et al. (2011) encontraram valores semelhantes para as taxas de fertilidade (67%) e eclosão (77%), mostrando que esta substância é de uso seguro. Observações dos autores, não-documentadas neste trabalho, mostraram também o desenvolvimento normal das larvas obtidas das fêmeas tratadas até dois meses após a eclosão. O presente estudo também não encontrou evidência de associação entre o uso de PG e as taxas de fecundidade relativas obtidas. Desta forma, concluímos que a PG exógena permitiu que o processo de ovulação ocorresse numa frequência maior de ovócitos fazendo com que as fêmeas concluíssem o processo de ovulação, refletindo diretamente nos maiores valores das porcentagens de desova encontradas nas fêmeas tratadas.

Como dito anteriormente, as análises morfométricas revelaram que o uso de PG reduz significativamente o número de ovócitos VR, os dados indicam que esta substância possibilitou um incremento na ovulação dos ovócitos com GVBD nas fêmeas tratadas. Resultados similares foram obtidos *in vitro* por Jalabert & Szallosi (1975) com a truta arco-íris. Neste caso folículos maturados *in vivo*, quando expostos *in vitro* à PGF foram induzidos

a ovulação. De acordo com os autores, esta resposta foi resultado do efeito da PGF na contração de células semelhantes a células musculares lisas presentes na camada teca do folículo. A ação estimuladora da PGF na ovulação foi também descrita *in vitro* com ovócitos de *Salvelinus fontinalis* (Goetz et al., 1982). De acordo com Stacey & Goetz (1982), as PGs sintetizadas nos ovários podem ser importantes especialmente na ruptura dos folículos e ovulação.

As PGs são naturalmente produzidas e liberadas por fêmeas de diversas espécies de peixes durante a desova. De acordo com Ogata et al. (1979) no *Misgurnus anguillicaudatus* os níveis de PG aumentaram de três a 12 horas após tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG). Em estudos com truta arco-íris, enfocando ovulação natural (Goetz & Cetta, 1983) e indução com hipófise (Cetta & Goetz, 1982), observaram um aumento significativo de PGF no plasma e nos ovários após a ovulação, em níveis que se mantiveram elevados durante 24 horas pós-ovulação. Além disso, Bouffard (1979) já havia demonstrado que o aumento nos níveis de PGF no fluído ovariano e no plasma só ocorre no final da ovulação. O autor sugeriu, ainda, que os elevados níveis de PGF pós-ovulação podem depender da presença de ovócitos ovulados junto ao lúmen. Em estudo *in vitro* realizado por Lister & Van der Kraak (2008) foi demonstrado que folículos vitelogênicos sintetizam a PGE₂ e PGF₂α na presença de ácido araquidônico, de forma dose dependente. Estes dados, analisados conjuntamente com a otimização na desova do pacu com o uso de PG, sugerem que possivelmente esta substância tem papel importante na ovulação desta espécie e que pode não estar sendo produzida e liberada de forma adequada durante a desova induzida. É completamente desconhecido porque algumas fêmeas de pacu hormonalmente induzidas com hipófise (peixes controle) desovam e outras não, no entanto, é possível que nas que não desovam não esteja ocorrendo um aumento adequado nos níveis de prostaglandina, sendo necessária a administração da substância exógena. Desta forma é necessário desenvolver estudos para avaliar a associação entre os níveis desta substância e a desova bem sucedida no pacu como também investigar o processo de contração muscular dos folículos e um possível papel das junções celulares adesivas sobre a ruptura dos folículos. Sendo assim, como demonstrado em mamíferos (Venutto et al., 1975), é possível também que as prostaglandinas também tenham um papel na regulação do fluxo sanguíneo no sistema reprodutivo de fêmeas de peixes durante a desova. As doses de PGF utilizadas no presente estudo (2 e 5mL por

peixe, em 2010 e 2011, respectivamente) foram calculadas com base nas doses aplicadas em outras espécies animais (bovinos, equinos e suínos), conforme o manual do produto.

Este estudo utilizou a PGF, mas outros compostos desta família de eicosanóides já foram testados como indutores de ovulação em peixes e as respostas variaram entre as espécies de peixes estudadas. A PGF foi a mais potente das PGs no processo de estimulação da ovulação da *Salvelinus fontinalis*, sendo que houve uma relação inversa entre os níveis de PGE, indicando que nesta espécie a PGE teve ação inibitória neste processo (Goetz et al., 1982). De acordo com Kagawa et al. (2003), as PGs PGE₂ e PGF_{1α} e PGF_{2α} induziram a ovulação *in vitro* de ovócitos da enguia japonesa, porém a PGE₁ foi ineficaz. Resultados similares haviam sido descritos por Goetz et al. (1991), em truta arco-íris e na perca-amarela. Em perca-amarela, as PGs F_{2α}, E₁, e E₂ (PGE₂) induziram ovulação em folículos bloqueados por indometacina, sendo a PGE₂ foi a mais efetiva (Goetz & Theofan, 1979). Desta forma, o uso de PGs, e não só a PGF, abre um grande gama de possibilidades para incrementar o processo de desova de peixes migradores nativos, que precisam invariavelmente ser induzidos à desova. Futuras abordagens podem identificar substâncias e doses específicas para cada espécie e para cada tipo de problema, tendo em vista que o pacu não é a única espécie nativa que apresenta problemas na ovulação em desovas induzidas.

Neste estudo, verificamos também outros aspectos importantes na biologia reprodutiva desta espécie. Nossos resultados confirmaram relatos de piscicultores sobre a variação no sucesso de desova do pacu. Os resultados mostraram que mesmo numa mesma desova, as fêmeas desovam em períodos diferentes, e que a maior parte das fêmeas desta espécie desova entre 276 e 323 UTA após a 2^o dose hormonal, no entanto, as maiores taxas de fertilidade estão relacionadas com as fêmeas que desovam mais cedo, ou seja, há uma queda expressiva nas taxas de fertilidade diretamente proporcional a um tempo maior de desova. Desta forma, seria interessante em futuras abordagens pesquisar mecanismos que estimulem as fêmeas a desovar antes, mesmo assim é possível que esta seja uma característica intrínseca de determinadas fêmeas. Outros estudos poderão indicar se fêmeas tratadas com PG desovam antes, e até mesmo, indicar doses e momentos de aplicação que tragam melhores resultados.

Com relação às desovas diferentes no mesmo ano, os resultados confirmaram relatos de produtores que comentam sobre a grande amplitude de variação nos resultados nas taxas de desova, fertilidade e eclosão entre coletas. Os resultados deste estudo mostraram uma grande amplitude de variação nos controles com relação a taxa de desova, realizados no mesmo ano,

e em anos consecutivos. Na estação reprodutiva de 2009/2010, enquanto aproximadamente 50% dos peixes desovaram na primeira desova, na segunda este valor subiu para 80% e caiu para 30% no ano seguinte, sendo todos os animais tratados com o mesmo protocolo. Além disso, as análises histomorfométricas e descritivas dos ovários não revelaram diferenças nos estádios de maturação ovariana (especialmente com relação a ovócitos atrésicos), permanecendo obscuro por que tais valores variaram desta forma. Não só as taxas de desova variam, mas também as taxas de fertilização e eclosão com apenas uma semana de diferença.

Em conclusão, os resultados aqui obtidos demonstram uma alternativa para tentar solucionar um problema comum na desova induzida do pacu e de outros peixes migradores através da utilização da PG, a qual pode aumentar as taxas de desova em fêmeas de *P. mesopotamicus* induzida a reprodução. A avaliação histomorfométrica dos ovários mostrou que o efeito desta substância foi especificamente sobre a ovulação, diminuindo a frequência de ovócitos VR.

Referências

- Alvarenga ER, França LR. 2009. Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biology of Reproduction*, 80:537-544.
- Abimorad EG, Squassoni GH, Carneiro DJ. 2008. Apparent digestibility of protein and amino acid in some selected feed ingredients for pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture Nutrition*, 14:374-380
- Bouffard RE. 1979. The role of prostaglandins during sexual maturation, ovulation and spermiation in the goldfish, *Carassius auratus*. M.Sc. Thesis, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia.
- Canario, AVM, Scott, AP. 1990. Identification of and development of radioimmunoassays for 17,21 – dihydroxy-4-pregnen-3, 20-dione in the ovaries of mature plaice (*Pleuronectes platessa*). *General and Comparative Endocrinology*, 78:273-285.

- Cetta F, Goetz F W. 1982. Ovarian and plasma prostaglandin E and F levels in brook trout during pituitary-induced ovulation. *Biology Reproduction*, 27:1216-1221.
- Goetz, FW, Theofan G. 1979. In vitro stimulation of germinal vesicle breakdown and ovulation of yellow perch (*Perca flavescens*) oocytes: Effects of 17,20 α - dihydroxy-4-pregnen-3-one and prostaglandins. *General and Comparative Endocrinology*, 37: 273-285.
- Goetz F W, Smith D C, Krickl S P. 1982. The effects of prostaglandins, phosphodiesterase inhibitors, and cyclic AMP on ovulation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) oocytes. *General and Comparative Endocrinology*. 48: 154-160.
- Goetz FW, Cetta F. 1983. Ovarian and plasma PGE and PGF in naturally ovulating brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the effects of indomethacin on prostaglandin levels. *Prostaglandins*, 26: 387-395.
- Goetz F W, Berndtson A K, Ranjan M. 1991. Ovulation: Mediators at the ovarian level. In: Kang PK, Schreiber MP, Jones R (eds). *Vertebrate Endocrinology, Fundamental and Biomedical Implications, Vol. IV, Reproduction*. Academic Press, New York; 127-203.
- Guerreiro LRJ, Dias JAD, Fornari DC, Ribeiro RP, Zanoni MA. Incubação de ovos e larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) em incubadoras do tipo israelense e Woynarovich. *Semina* 2011;32:781-794.
- Gurr E.1971. *Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry*; Academic Press, London, England.
- Hainfellner P, Munõz ME, De Souza TG, Batlouni SR, Freitas GA. 2011. A falha na desova de fêmeas de *Brycon amazonicus* pode estar relacionada com ovulação e não com a indução a maturação final dos ovócitos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. (in press).
- Jalabert B, Szollosi D. (1975). In vitro ovulation of trout oocytes: effect of prostaglandin on smooth muscle-like cells of the theca. *Prostaglandins*, 9: 765-779.
- Jomori RK, Ducatti C, Carneiro DJ, Portella MC.2008. Stable carbon (d13C) and nitrogen (d15N) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. *Aquaculture Research*, 39:370-381.
- Kagawa H, Tanaka H, Unuma T, Ohta H, Geen K, Ozukawa K. 2003. Role of prostaglandin in the control of ovulation in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*, 69: 234-241.

- Lister A, Van Der Kraak GJ. 2008. An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. *General and Comparative Endocrinology*, 159: 46-57.
- Lister A, Van Der Kraak GJ. 2009. Regulation of prostaglandin synthesis in ovaries of sexually-mature zebrafish (*Danio rerio*). *Molecular Reproduction & Development*, 76: 1064-1075.
- MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura. *Boletim Estatística da Pesca e Aquicultura 2008-2010*. Disponible at: <HTTP://www.mpa.gov.br> Accessed at: 10/21/2012
- Moses R, Haider, S. 1999. Confirmation of maturation induced esteroids in a freshwater catfish, *Clarias batrachus*, In: 6° International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Bergen, July 4-5.
- Munakata A, Kobayashi M. 2010. Endocrine control of sexual behavior in teleosts fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 456-468.
- Nagahama Y, Yamashita M. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development Growth Differentiation*, 50: 195-219.
- Ogata H, Nomura T, Hata M. 1979. Prostaglandin F₂ alfa changes induced by ovulatory stimuli in the pond loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Bull. Jap. Soc. Scient Fish.* 45: 929-931.
- Patiño R, Yoshizaki G, Bolamba D, Thomas P. 2003. Role of Arachidonic Acid and protein kinase C during maturation-Inducing hormone dependent meiotic resumption and ovulation in ovarian follicles of Atlantic croaker. *Biology of Reproduction*, 68: 516–523.
- Sorbera L, Asturiano J, Carrillo M, Zanuy S. 2001. Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, 64: 382–389.
- Stacey N E, Pandey S. 1975. Effects of indomethacin and prostaglandins on ovulation of goldfish. *Prostaglandins*, 9:597-607.
- Stacey N E, Goetz F W. 1982. Role of prostaglandin in fish reproduction. *Canadian Journal. Fisheries and Aquatic Science*, 39:92-98.
- STATSOFT, Inc. Statistica: data analysis software system, version 7, 2004.
- Urbinati EC, Goncalves FD, Takahashi LS. Pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: Baldisseroto B, Gomes LC, editors. *Espécies Nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Editora UFSM; 2010. p.1-606.

Venutto RC, O'Dorisio T, Stein JH, Ferris TF. 1975. Uterine prostaglandin E secretion and uterine blood flow in the pregnant rabbit. *The Journal of Clinical Investigation*, 55:193-197.

Villars TA, Hale N, Chapnick D. 1985. Prostaglandin- $F_{2\alpha}$ stimulates reproductive behavior of female paradise fish (*Macropodus opercularis*). *Hormones and Behavior*, 19: 21-35.