

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO
DE MESQUITA FILHO” - UNESP**

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Extrato bruto de hipófise de lambari
Astyanax altiparanae (Characiformes:
Characidae) como indutor de desova de
espécies nativas.**

Doutoranda: Laíza Maria De Jesus Silva

Bióloga

Jaboticabal, São Paulo

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO
DE MESQUITA FILHO” - UNESP**

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Extrato bruto de hipófise de lambari
Astyanax altiparanae (Characiformes:
Characidae) como indutor de desova de
espécies nativas.**

Doutoranda: Laíza Maria De Jesus Silva

Orientador: Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em
Aquicultura do Centro de
Aquicultura da UNESP -
CAUNESP, como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Doutor.

Jaboticabal, São Paulo

2019

S586e Silva, Laíza Maria de Jesus
Extrato bruto de hipófise de lambari *Astyanax altiparanae*
(Characiformes: Characidae) como indutor de desova de espécies
nativas / Laíza Maria de Jesus Silva. -- Jaboticabal, 2019.
ii, 65 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2019
Orientador: Sergio Ricardo Batlouni
Banca examinadora: Cristiéle da Silva Ribeiro, Lucas Simon
Torati, Maria Inês Borella, Renata Guimarães Moreira Whitton.
Bibliografia

1. Biotecnologia. 2. Desempenho reprodutivo. 3. Estradiol. 4.
Reprodução induzida. 5. 17,20 β -P. 6. Curimba. I. Título. II.
Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.034

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Extrato bruto de hipófise de lambari *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae)
como indutor de desova em espécies nativas

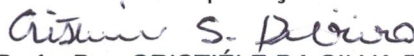
AUTORA: LAÍZA MARIA DE JESUS SILVA

ORIENTADOR: SERGIO RICARDO BATLOUNI

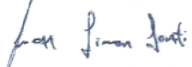
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AQUICULTURA,
pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI

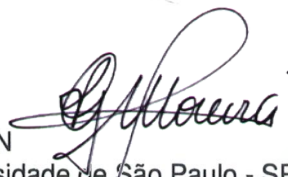
Laboratório de Reprodução de Peixes / Centro de Aquicultura da UNESP-CAUNESP


Profa. Dra. CRISTIÉLE DA SILVA RIBEIRO

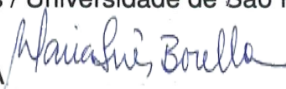
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira/ FEIS - UNESP


Dr. LUCAS SIMON TORATI

Embrapa Pesca e Aquicultura / EMBRAPA, Palmas-TO


Professor Titular RENATA GUIMARÃES MOREIRA WHITTON

Departamento de Fisiologia - Instituto de Biociências / Universidade de São Paulo - SP


Professor Assistente Doutor MARIA INÊS BORELLA

Departamento de Histologia e Embriologia / UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Jaboticabal, 12 de novembro de 2019.

Sumário

Agradecimentos	6
Apoio financeiro.....	9
Resumo	10
Abstract	11
Lista de figuras	13
Lista de tabelas	17
Lista de abreviações	18
1. Introdução e Justificativa do Tema	20
1.1. Reprodução induzida em peixes	20
1.2. Endocrinologia da reprodução dos peixes	21
1.3. Histórico da hipofiseção	23
1.4. Caracterização da espécie: <i>Astyanax altiparanae</i>	24
2. Objetivo geral:.....	25
3. Justificativa do projeto	26
4. Material e métodos:	26
4.1. Experimento 1:	27
4.1.1. Delineamento experimental:	27
Tabela 1. Análise físico-químicas da água dos viveiros.....	28
4.2. Experimento 2	29
4.2.1. Delineamento experimental:.....	29
4.3. Experimento 3	31
4.3.1. Delineamento experimental:	31
4.4. Experimento 4	31
4.4.1. Delineamento experimental:	31
4.5. Experimento 5:	33
4.5.1. Delineamento experimental:	33
4.6. Experimento 6	34
4.6.1. Delineamento experimental:	34
4.7. Análises das amostras:	35
4.8. Análise dos dados:	37
5. Resultados.....	38
5.1. Descrição morfológica dos oócitos de <i>A. altiparanae</i> :.....	38
5.2. Experimento 1: Análise das características reprodutivas das fêmeas doadoras de hipófises de <i>A. altiparanae</i>	41

5.3. Experimento 2: Indução hormonal em fêmeas de <i>A. altiparanae</i> com aplicação de dose única.....	42
5.3.1. Índice gonadossomático (IGS):.....	42
5.3.3. Densidade volumétrica:.....	43
5.4. Experimento 3 – Indução hormonal em fêmeas de <i>A. altiparanae</i> em dose única.....	45
5.4.1. Desempenho reprodutivo.....	45
5.5. Experimento 4: Indução hormonal em fêmeas de <i>A. altiparanae</i> com aplicação fracionada de dose.	46
5.5.1. Índice gonadossomático (IGS):.....	46
5.5.2. Desempenho reprodutivo:.....	48
5.5.3. Densidade volumétrica nos diferentes grupos:	49
5.5.4. Densidade volumétrica comparando dentro de cada grupo:.....	51
5.6. Experimento 5:	54
a) Análise das características reprodutivas das fêmeas doadoras de hipófises de <i>A. altiparanae</i> para indução hormonal de fêmeas de <i>P. lineatus</i> :	54
5.7. Experimento 6 - Indução hormonal em fêmeas em <i>P. lineatus</i> com aplicação fracionada de doses.....	55
6. Discussão	55
7. Considerações finais.....	61
8. Referências.....	61

Dedico minha tese, aos meus avós e minha mãe, por sempre apoiarem meus sonhos, por estarem ao meu lado em todos os momentos, me lembrando o quanto sou amada e querida por eles.

Agradecimentos

Primeiramente, a minha avó, Josefa, por ser tão presente na minha vida, por ser minha maior incentivadora e me dar tanto amor e carinho. Meu maior exemplo de amor, luta e coragem, agradeço imensamente por despertar em mim a paixão pela confeitaria. E a minha mãe, Aracelis, por me apoiar em todas as minhas escolhas, incentivar nos momentos mais difíceis, e por todo amor recebido.

Ao meu tio, Antônio Marcos (*in memoriam*), que gostaria de estar presente neste momento tão especial da minha vida acadêmica, mas agora torce por mim espiritualmente.

Ao meu pai, João, por todo amor, carinho e generosidade, principalmente me apoiando e possibilitando que eu realizasse o sonho de cursar uma universidade pública.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni, por aceitar me orientar no doutorado sem mesmo me conhecer e me receber tão bem. Sou muito grata por me possibilitar trabalhar com este projeto e confiar que eu seria capaz de desenvolvê-lo. Com toda certeza, você é um grande profissional, no qual me espelho, por todo seu conhecimento, dedicação, profissionalismo, incentivo e principalmente, otimismo e disponibilidade em tirar minhas dúvidas. É ótimo trabalhar com pessoas que nos dão liberdade, acreditam e confiam no nosso potencial. Meu muito obrigada!

Ao Laboratório de Reprodução de Peixes Nativos, Adalberto, Guilherme, Marina, Rafael Sato, Xina. Em especial, Rafael Kuradomi, que me ajudou muito no primeiro ano de doutorado, e a Gabriela Brambila, que me ensinou a extrair as hipófises. Agradeço aos cafés, conversas, risadas e principalmente ajuda nos meus experimentos, vocês são uma grande equipe.

A Mariana Roza De Abreu, que além de ser minha colega de laboratório, é uma grande amiga, pela qual tenho imenso carinho, agradecimento e admiração. Agradeço por compartilhar seu conhecimento científico, por me auxiliar na estatística, nas inúmeras coletas, principalmente das hipófises, que é um trabalho que exige muito cuidado, concentração e tempo. Além disso,

agradeço a amizade fora do laboratório, por me dar leveza nesta longa caminhada, pelas conversas, carinho e paciência.

Aos membros da banca da qualificação, Prof^a Dr^a Cristiéle S. Ribeiro e Prof^a Dr^a Laura S. O. Nakaghi, por aceitarem meu convite e pelas ricas sugestões e correções para que eu pudesse melhorar meu trabalho.

Aos membros da banca de defesa, Prof^a Dr^a Cristiéle S. Ribeiro, Dr. Lucas S. Torati, Prof^a Dr^a Maria Inês Borella e Prof^a Dr^a Renata Guimarães Moreira Whitton, por aceitarem meu convite contribuindo com suas experiências, conhecimento, correções e sugestões. Obrigada por participarem deste momento tão sonhado e gratificante.

A turma de Ciências Biológicas 2009 da Unesp de Ilha Solteira, por me proporcionar conhecer pessoas incríveis e viver os melhores momentos da minha vida.

A Ingrid Amaral, que me acolheu em sua casa na minha mudança para Jaboticabal, me recebeu com muito carinho e me ajudou na minha adaptação. Agradeço aos nossos 10 anos de amizade desde a graduação, sempre me acolhendo com sua amizade, carinho e amor. Também agradeço por compartilhar seu cachorrinho, Bilbinho, o qual se tornou meu grande companheiro de quatro patas.

A Juliana Teramachi e Jéssica Marques, que foram imprescindíveis na minha mudança para Jaboticabal, tiveram muita paciência, carinho e amizade.

Ao meu grande amigo, Wanderson Rodrigues, que desde a graduação, me presenteia com sua amizade, carinho, conselhos e sabedoria.

Aos funcionários do Caunesp, Luiz, Marcio e Valdecir que nos auxiliaram na seleção dos reprodutores e nos experimentos. A Elaine, Eleusa, Lúcia, Mayara, Silvinha e Suerly sempre nos alegrando com suas conversas e simpatia.

A David Lorente, pela atenção e paciência em sempre nos ajudar com os assuntos da Pós-graduação.

Aos meus amigos de Ilha Solteira, Cristiane Bashiyo, Jumma Miranda e Renan Leão, que mesmo não estando mais presentes no meu convívio, sempre estão presentes em meu pensamento. Vocês fazem parte desta conquista.

A Allana Feitoza, Andressa Tellechea, Monique Viraes e Thaís Silva que se tornaram muito especiais nesta etapa final.

A minha tia Laura e avó Lúcia, por serem tão atenciosas, carinhosas e acreditarem em mim.

A Dona Zilda, por todo cuidado, amizade e amor. Agradeço por tudo o que fez por mim, por nossos almoços de domingo, por nossas caminhadas e conversas. Nunca me esquecerei da senhora, te guardo em meu coração.

A Dona Cidinha, uma pessoa muito querida e imensamente generosa por quem tenho muita admiração e carinho.

A confeitaria, que me despertou uma grande paixão, momentos de descontração e principalmente uma renda extra.

Apoio financeiro

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Resumo

Nosso principal objetivo foi testar o uso do extrato bruto de hipófise de lambari (EBHL) na reprodução induzida de *Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus*. No experimento 1, comparamos as características reprodutivas de lambaris (obtenção do EBHL) amostrados em outubro (OUT) e dezembro (DEZ). Então, fêmeas e machos (n=2500) foram distribuídos aleatoriamente em 10 viveiros escavados (3,08 peixes/m²). Assim, 1 fêmea de cada viveiro foi amostrada em OUT (n=5) e DEZ (n=5). Nos experimentos 2 e 3, foram testados EBHL de OUT e DEZ para indução hormonal de lambari em dose única. Nestes experimentos, 0,9% NaCl (C) e 6 mg. Kg⁻¹ CP (extrato bruto de hipófise de carpa) foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. No experimento 4, fracionamos as doses e adicionamos o controle sem manipulação hormonal (CC). No experimento 5, novos EBHL foram obtidos como no experimento 1. No experimento 6, testamos o EBHL para indução hormonal de curimba. Desta forma, no experimento 1, as características das fêmeas doadoras de OUT e DEZ foram similares (p>0,05) indicando que EBHL pode ser coletado ambos os meses. Nos experimentos 2 e 3 observamos desempenho reprodutivo similar entre os grupos. No experimento 4, o fracionamento das doses diminuiu a heterogeneidade no desempenho (observadas nos experimentos 2 e 3) e apenas neste experimento, pelo menos uma réplica de cada tratamento apresentou desova, exceto CC. No experimento 6, EBHL promoveu a ovulação em *P. lineatus*. Assim, neste estudo mostramos que o EBHL pode ser usado para reprodução induzida de *A. altiparanae* e *P. lineatus*. Assim observamos que o EBHL assim como o CP, apenas intensificou alguns parâmetros reprodutivos no lambari. Já no curimba, o EBHL e o CP induziram as desovas. Portanto, *A. altiparanae* não se mostrou um bom modelo biológico para o desempenho reprodutivo, pois algumas fêmeas desovaram sem necessidade de indução e, mesmo com uso de CP (amplamente usado em pesquisas e por produtores), poucas fêmeas ovularam. Portanto, neste estudo definimos de forma inédita um protocolo para coleta de EBHL que permite obter hipófises de fêmeas maduras e é capaz de induzir a desova.

PALAVRAS-CHAVE: biotecnologia, desempenho reprodutivo, estradiol, reprodução induzida, 17,20 β -P, curimba.

Abstract

Our main goal was to test the lambari pituitary extract (EBHL) in the induced reproduction of *Astyanax altiparanae* and *Prochilodus lineatus*. In the experiment 1 we compared the reproductive features of lambari (to obtain the EBHL) sampled at October (OUT) and December (DEZ). Thus, females and males (n = 2500) were distributed in 10 earthen ponds (3.08 fish / m²), and then 1 female from each earthen pond was sampled in OUT (n = 5) and in DEZ (n = 5). In the experiments 2 and 3 we tested the use of EBHL from OUT and DEZ to induce the reproduction of lambari in a single dose. Moreover, 0.9% NaCl (C) and 6 mg. Kg⁻¹ CP (carp pituitary extract) were applied as negative and positive control, respectively. In the experiment 4 we applied the fractioned doses (10% + 90%) and added one control without handling (CC). In the experiment 5 a new batch of EBHL was collected using the same methods as in Experiment 1. In the experiment 6 we tested the use of EBHL to induce the reproduction of curimba. In the experiment 1 we observed that the EBHL's donor from OUT and DEZ showed similar characteristics (p>0.05), indicating that the EBHL can be collected in both months. In the experiments 2 and 3 the reproductive performance was similar among groups. The application of two doses (experiment 4) decreased the reproductive performance heterogeneity in relation to experiments 2 and 3, and in this experiment at least one replicate of each treatment showed spawning (except for CC). In the experiment 6 the EBHL could induce the ovulation in *P. lineatus*. In summary, in this study we are showing that the EBHL was able to induce the reproduction of lambari and curimba. In the case of the former, EBHL as well as CP only intensified some reproductive parameters. In the case of curimba the ovulation was induced only when we used EBHL or CP. Lambari did not prove to be a good biological model for reproductive performance, because some females spawn without induction and, even with CP (widely used in research and by fish farmers), a reduced number of females ovulated. Finally, in this study we have for the first

time a protocol for EBHL collection from mature females, which could induce the ovulation in two native species.

KEYWORDS: biotechnology, reproductive performance, induced reproduction, estradiol, 17,20 β -P, curimba.

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama para análise das características reprodutivas das fêmeas doadoras de OUT e DEZ no experimento 1 para indução hormonal da própria espécie.

Abreviações: extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ). 29

Figura 2. Diagrama de indução hormonal com aplicação de dose única de 6 mg. Kg⁻¹ de OUT, DEZ, CP e C (0,9% NaCl) em fêmeas de *A. altiparanae* nos experimentos 2 e 3. **Abreviações:** extrato bruto de hipófise de lambari coletado em outubro (OUT), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ), controle positivo (CP) e controle negativo (C). 30

Figura 3. Diagrama de indução hormonal com aplicação fracionada de doses de 0,6 mg. Kg⁻¹ e 5,4 mg. Kg⁻¹ de OUT, DEZ, CP e C (0,9% NaCl) em fêmeas de *A. altiparanae* no experimento 4. **Abreviações:** extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ), controle positivo (CP), controle negativo (C) e controle sem manipulação hormonal (CC). 32

Figura 4. Diagrama para análise das características reprodutivas das fêmeas doadoras de (OUT) para indução hormonal de *P. lineatus* no experimento 6. **Abreviações:** extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletada no mês de outubro (OUT). 34

Figura 5. Diagrama de indução hormonal com aplicação fracionada de doses de 0,6 mg. Kg⁻¹ e 5,4 mg. Kg⁻¹ de OUT, CP e C (0,9% Na Cl) em fêmeas de *P. lineatus* no experimento 6. **Abreviações:** extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT), controle positivo (CP) e controle negativo (C). 35

Figura 6. Oogênese em *A. altiparanae*. a) oócito previtelogênico inicial (opi) com nucléolos (nu) dispostos na periferia do núcleo; b) oócito previtelogênico final (opf) com aparecimento dos alvéolos corticais (ac); c) oócito vitelogênico inicial (ovi) caracterizado pelo surgimento dos grânulos de vitelo (gv); d) oócito vitelogênico final (ovf) com ocupação dos grânulos de vitelo (gv) por todo citoplasma; e) oócito com rompimento da vesícula germinativa (gvbd) em todo citoplasma; f) oócito atrésico (at) com zona radiata irregular (zr) e camada folicular descontínua (cf); g) folículo pós ovulatório destacando as estruturas remanescentes dos ovários após a oocitação: camadas da teca e foliculares (cf); h) tecido intersticial (ti) tecido conjuntivo que reveste os ovários dando suporte ao longo de todo desenvolvimento dos oócitos. Coloração: hematoxilina/eosina. 40

Figura 7. Densidade volumétrica dos oócitos em fêmeas doadoras de *A. altiparanae* classificados nos diferentes estágios de desenvolvimento nos meses outubro (OUT) e dezembro (DEZ) no experimento 1. Abreviações: fpo (folículo pós-ovulatório); opi (oócito previtelogênico inicial); opf (oócito previtelogênico final); ovi (oócito vitelogênico inicial); ovf (oócito vitelogênico final); gvbd (oócito com rompimento da vesícula germinativa); at (oócito atrésico) e ti (tecido intersticial). Os grupos foram analisados por Teste Man U Whitney ($p < 0,05$). Os dados foram representados por mediana, primeiro e terceiro quartil ($n = 10$)..... 41

Figura 8. Índice gonadossomático (IGS) em fêmeas não desovadas ($n=24$) de *A. altiparanae* no experimento 2. **Abreviações:** grupo inicial (IN), controle negativo (C), controle sem manipulação (CC), controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari de *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari de *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ). Os grupos foram analisados por teste Kruskal Wallis ($p < 0,05$) e os dados foram representados por mediana, primeiro e terceiro quartil..... 42

Figura 9. Densidade volumétrica dos estágios dos oócitos em fêmeas desovadas ($n=18$) e não desovadas ($n=18$) de *A. altiparanae* no experimento 2. **Abreviações:** grupo inicial (IN), controle negativo (C), controle positivo (CP), controle sem manipulação hormonal (CC), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ); fpo (folículo pós-ovulatório); opi (oócito previtelogênico inicial); opf (oócito previtelogênico final); ovi (oócito vitelogênico inicial); ovf (oócito vitelogênico final); gvbd (oócito com rompimento da vesícula germinativa); at (oócito atrésico) e ti (tecido intersticial). Todos os grupos foram analisados por Kruskal-Wallis, letras iguais não representaram diferença significativa ($p > 0,05$) e letras diferentes representaram diferença significativa ($p < 0,05$). Os dados foram representados por mediana, primeiro e terceiro quartil. 45

Figura 10. Índice gonadossomático (IGS) em fêmeas de *A. altiparanae* no experimento 4. A) Fêmeas desovadas ($n=15$). B) Fêmeas não desovadas ($n=15$). **Abreviações:** grupo inicial (IN), controle positivo (CP), controle negativo (C), controle sem manipulação hormonal (CC), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ). Os grupos foram analisados por One-Way ANOVA ($p > 0,05$) seguido de teste Tukey HSD ($p < 0,05$) e os dados foram representados por média e desvio padrão 47

Figura 11. Densidade volumétrica dos estágios dos oócitos em *A. altiparanae* no experimento 4. A) Fêmeas desovadas (n=18); B) fêmeas não desovadas (n=18).

Abreviações: grupo inicial (IN), controle positivo (CP), controle negativo (C), controle sem manipulação hormonal (CC) extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* em dezembro (DEZ); fpo (folículo pós-ovulatório); opi (oócito previtelogênico inicial); opf (oócito previtelogênico final); ovi (oócito vitelogênico inicial); ovf (oócito vitelogênico final); gvbd (oócito com rompimento da vesícula germinativa); at (oócito atrésico) e ti (tecido intersticial). Todos os grupos foram analisados por Kruskal-Wallis, letras iguais não representaram diferença significativa ($p>0.05$) e letras diferentes representaram diferença significativa ($p<0.05$). Os dados foram representados por mediana, primeiro e terceiro quartil. 50

Figura 12. A-C) Comparação da densidade volumétrica dos oócitos em fêmeas desovadas e não desovadas em *A. altiparanae* nos grupos controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e em dezembro (DEZ) no experimento 4. **Abreviações:** fpo (folículo pós-ovulatório); opi (oócito previtelogênico inicial); opf (oócito previtelogênico final); ovi (oócito vitelogênico inicial); ovf (oócito vitelogênico final); gvbd (oócito com rompimento da vesícula germinativa); at (oócito atrésico) e ti (tecido intersticial). Os grupos foram analisados por Teste Man U Whitney ($p<0.05$), letras iguais não representaram diferença ($p>0.05$) e letras diferentes representaram diferença significativa ($p<0.05$). Os dados foram representados por mediana, primeiro e terceiro quartil (n=10). 52

Figura 13. Níveis plasmáticos de $17,20 \beta\text{-P}$ (ng. mL^{-1}) em fêmeas de *A. altiparanae* no experimento 4. A) Fêmeas desovadas (n=15), os grupos foram analisados por teste Kruskal Wallis ($p<0.05$) e os dados foram representados por mediana, primeiro e terceiro quartil. B) Fêmeas não desovadas (n=26), os grupos foram analisados por One-Way ANOVA ($p>0.05$) seguido por teste Tukey HSD ($p<0.05$) e os dados foram representados por média e desvio padrão. Letras iguais não representaram diferença significativa ($p>0.05$) e letras diferentes representaram diferença significativa ($p<0.05$). **Abreviações:** grupos: inicial (IN), controle negativo (C), controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari em outubro (OUT) e dezembro (DEZ). 53

Figura 14. Densidade volumétrica dos oócitos em fêmeas doadoras de *A. altiparanae* (n=5) classificados nos diferentes estágios de desenvolvimento no mês de outubro (OUT) no experimento 5. **Abreviações:** fpo (folículo pós-ovulatório); opi (oócito previtelogênico inicial); opf (oócito previtelogênico final); ovi (oócito vitelogênico inicial); ovf (oócito vitelogênico final); gvbd (oócito com rompimento da vesícula germinativa);

at (oócito atrésico) e ti (tecido intersticial). Os dados foram representados por media e desvio padrão..... 54

Lista de tabelas

Tabela 1. Análise físico-químicas da água dos experimentos.....	28
Tabela 2. Cálculo das variáveis de desempenho reprodutivo.	37
Tabela 3. Comparação de IGS (%), dos níveis plasmáticos de E ₂ (ng. mL ⁻¹), 17,20β-P (ng. mL ⁻¹) em fêmeas doadoras de hipófises de <i>A. altiparanae</i> nos meses de outubro (OUT) e dezembro (DEZ) no experimento 1.	41
Tabela 4. Desempenho reprodutivo com dose única de 6mg.Kg ⁻¹ de OUT, DEZ, CP e C (0,9%NaCl) em fêmeas de <i>A. altiparanae</i> no experimento 2. Abreviações: controle negativo (C), controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari <i>A. altiparanae</i> coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari coletado em dezembro (DEZ).	43
Tabela 5. Densidade volumétrica dos oócitos em fêmeas desovadas de <i>A. altiparanae</i> classificados nos diferentes estágios de desenvolvimento induzidas com dose única de 6mg.Kg ⁻¹ de CP, OUT, DEZ, C (0,9%NaCl) e IN no experimento 2. Abreviações: controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari <i>A. altiparanae</i> coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari <i>A. altiparanae</i> coletado em dezembro (DEZ), controle negativo (C).....	44
Tabela 6. Desempenho reprodutivo com dose única de 6 mg. Kg ⁻¹ de CP, OUT, DEZ e C (0,9%NaCl) em <i>A. altiparanae</i> no experimento 3. Abreviações: controle negativo (C), controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari <i>A. altiparanae</i> coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari <i>A. altiparanae</i> coletado em dezembro (DEZ), ...	46
Tabela 7. Desempenho reprodutivo de fêmeas de <i>A. altiparanae</i> induzidas com dose única de 6mg.Kg ⁻¹ de CP, OUT, DEZ e C (0,9% NaCl) no experimento 4. Abreviações: controle negativo (C), controle sem manipulação hormonal (CC), controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari <i>A. altiparanae</i> coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari <i>A. altiparanae</i> coletado em dezembro (DEZ).	48
Tabela 8. Avaliação de IGS (%), de níveis plasmáticos de E ₂ (ng. mL ⁻¹) e, 17,20β-P (ng. mL ⁻¹) em fêmeas doadoras de hipófises de <i>A. altiparanae</i> no mês de outubro (OUT).	54
Tabela 9. Desempenho reprodutivo de fêmeas de <i>P. lineatus</i> induzidas com dose fracionada de 6mg.Kg ⁻¹ de CP, OUT e C (0,9%NaCl) no experimento 6. Abreviações: controle negativo (C), controle positivo (CP) e extrato bruto de hipófise de lambari <i>A. altiparanae</i> coletado em outubro (OUT).	55

Lista de abreviações

17, 20 β -P - 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one

AT - Oócito atrésico

C – Solução salina (0,9%NaCl) – controle negativo

CC – Controle sem manipulação

CEPTA- Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura

CP – Extrato bruto de hipófise de carpa (controle positivo)

DEZ – Extrato bruto de hipófise de lambari coletado em dezembro

E₂ - 17 β - estradiol

EBHC - Extrato bruto de hipófise de carpa

EBHL- Extrato bruto de hipófise de *A. altiparanae*

eCG: Gonadotropina coriônica equina

FAO – *Food and Agriculture Organization of United Nations*

FPO - Folículo pós ovulatório

FSH - Hormônio folículo estimulante

GnRH- Hormônio liberador de gonadotropinas

GnRHm- análogo do hormônio liberador de gonadotropina de mamíferos

sGnRH - - análogo do hormônio liberador de gonadotropina de salmão

GVBD – Oócito com rompimento da vesícula germinativa

hCG – Hormônio gonadotrópico coriônico

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGS - Índice gonadossomático

IN- Grupo inicial

LH - Hormônio luteinizante

MIS - *Maturation inducing steroid*

MPA- Ministério de Pesca e Aquicultura

OPF - Oócito previtelogênico final

OPI- Oócito pré-vitelogênico

OUT – Extrato bruto de hipófise de lambari coletado em outubro

OVF - Oócito vitelogênico final

OVI - Oócito vitelogênico inicial

TI - Tecido intersticial

1. Introdução e Justificativa do Tema

A aquicultura tem mostrado um grande crescimento nas últimas décadas representando 47% na produção mundial de peixes. Em contrapartida a pesca se manteve praticamente estagnada desde a década de 80. Dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO (2018) apontaram que houve um crescimento médio anual no consumo de peixes como fonte de alimento em torno de 3,2% ultrapassando o crescimento populacional que se manteve em 1,6%.

O Brasil ocupa 13º lugar no *ranking* dos maiores países produtores na aquicultura continental (FAO, 2018). Dentre esta destaca-se a piscicultura que produziu 722.560 toneladas de peixes em 2018 alcançando uma taxa de crescimento de 4,5% comparado ao ano anterior de acordo com o levantamento da Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE BR, 2019). Embora a produção de tilápia lidere o *ranking* de peixes cultivados no país, um grande número de espécies nativas também se destaca na produção como tambaqui, tambacu, pacu entre outros (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2017) que apresentam um grande potencial para piscicultura e são importantes economicamente. Entretanto a falta de pacote tecnológico para as espécies nativas ainda é um entrave na sua produção, visto que a produção das espécies exóticas, como a tilápia, está mais relacionada as informações e tecnologias disponíveis do que as características destes animais (MPA, 2014).

1.1. Reprodução induzida em peixes

A maioria dos peixes reofílicos realizam migração para desovar ao longo da estação chuvosa a fim de garantir maiores chances de sobrevivência para sua prole, como abrigo e alimento (MURGAS et al., 2011). No entanto, quando estes animais são mantidos em cativeiro não recebem determinados estímulos do ambiente que são fundamentais para a maturação final dos gametas e desova ocasionando apenas o desenvolvimento parcial dos ovários (ANDRADE; YASUI, 2003). Por isso é necessária a aplicação de técnicas de indução hormonal (ZOHAR; MYLONAS, 2007; MYLONAS, FOSTIER, ZANUY; 2010; SOLIS-MURGAS et al., 2011) para que se reproduzam em cativeiro.

A técnica mais utilizada é a hipofisação que consiste na aplicação de extrato bruto de hipófise de peixes maduros para indução a maturação final e desova (NUNES et al., 2018). Desta forma, a hipofisação, possibilita que a ovulação e desova sejam alcançadas e equivale a “um atalho” do processo natural. Na natureza, a ovulação nos peixes é regulada por meio de seus próprios hormônios gonadotrópicos, que são produzidos e armazenados pela hipófise, posteriormente liberados via corrente sanguínea. Entretanto, no método de hipofisação, o hormônio gonadotrópico é extraído da hipófise de um doador e injetado em um receptor, no caso os reprodutores, que desencadeia a maturação final e ovulação nas fêmeas (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983).

Além da hipofisação, há outras alternativas de indução que utilizam hormônios sintéticos como análogo do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) (FELIZARDO et al., 2012), análogo do hormônio liberador de gonadotropina de mamíferos (mGnRHa) (PEREIRA et al., 2018; SOUZA et al., 2018), análogo liberador de gonadotropina de salmão (sGnRH) (ITTZES et al., 2014), análogo liberador de gonadotropina de salmão associado a domperidona (Ovaprim) (VIVEIROS et al., 2013); gonadotropina coriônica equina (eCG) (PEREIRA et al., 2009); hormônio gonadotrópico coriônico humano (hCG) (BRAMBILA-SOUZA et al., 2019) que podem atuar na hipófise ou diretamente nas gônadas.

Neste sentido, diversos trabalhos estão sendo desenvolvidos com intuito de estabelecer protocolos mais eficientes com o uso de hormônios sintéticos, entretanto os resultados ainda são pouco satisfatórios com baixas taxas de desova e fertilização (CARNEIRO; MIKOS, 2008), comprometimento no desenvolvimento dos embriões (ACUÑA; RANGEL, 2009; PAULINO et al., 2011; SOUZA, 2015) ou baixa qualidade de ovos (PODHOREC et al., 2016).

1.2. Endocrinologia da reprodução dos peixes

Em síntese, a reprodução dos peixes é modulada por estímulos externos que são percebidos por receptores sensoriais no hipotálamo, que está ligado a outro órgão endócrino, a hipófise (BALDISSEROTTO, 2013) através de um pequeno pedúnculo que consiste em fibras neuro-secretoras (ZOHAR et al., 2010). A hipófise é controlada por um grande número de neuropeptídios que

são sintetizados por neurônios específicos (ZOHAR et al., 2010). Ela tem como função produzir e regular a ação das gonadotropinas, como o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) (PETER; YU, 1997; LEVAVI-SIVAN et al., 2010, YARON; LEVAVI-SIVAN; 2011). Segundo Mehdi, Mousavi e Ehsan (2011) o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas permite a sincronização de todos os mecanismos envolvidos com o ciclo reprodutivo dos peixes.

Resumidamente, o FSH atua nas células da teca e converte o colesterol em testosterona, que por sua vez se difunde para as células foliculares onde é convertida em 17 β -estradiol (E₂) pela ação da P450 aromatase (BALDISSEROTTO, 2013). O E₂ atua no fígado, estimulando a produção de vitelogenina (NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008; CLELLAND; PENG, 2009). Já o LH atua nas células foliculares estimulando a produção do 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20 β -P), por isso inibe a atividade da enzima P450 aromatase e reduz a secreção do E₂ e aumenta a atividade da enzima 20 β – hidroxisteróide desidrogenase (20 β -HSD) elevando os níveis de produção do 17,20 β -P (BALDISSEROTTO, 2013), considerado o esteroide indutor da maturação (do inglês MIS – *maturation inducing steroid*) (NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008). Assim, o principal papel do LH está relacionado à ovulação nos peixes (CRESPO et al., 2013; OGIWARA et al., 2013; BORELLA et al., 2014; TAKAHASHI et al., 2016; TANG et al., 2017).

Segundo Zohar e Mylonas (2001) a falta de liberação de LH na corrente sanguínea pela hipófise causa falhas na reprodução como na ovulação e desova em peixes mantidos em cativeiro. Assim, estes autores reportaram que há 3 tipos de disfunções reprodutivas como: falha completa na vitelogênese, ausência de maturação final e por última ausência de ovulação, conseguinte os animais não desovam.

Deste modo Levavi-Sivan et al. (2010) destacam que os aspectos reprodutivos em peixes podem ser aprimorados por meio do desenvolvimento de técnicas que alteram e controlam a secreção de hormônios da hipófise. Porém, estas manipulações requerem o entendimento dos mecanismos que coordenam o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

1.3. Histórico da hipofisação

Os primeiros trabalhos de indução hormonal foram iniciados paralelamente com Houssay em 1930 na Argentina e Von Ihering em 1935 no Brasil (ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007) com a aplicação de hipófises frescas provenientes de peixes maduros (DONALDSON; HUNTER, 1983). Ambos pesquisadores obtiveram sucesso com o desenvolvimento da técnica, denominada de hipofisação (ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007). No entanto, somente na década de 70 foram alcançados resultados significativos no desenvolvimento das técnicas reprodutivas em peixes migradores nativos com a participação da equipe do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) (ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007).

No final da década de 80, o primeiro banco de hipófises oriundas do curimba (*Prochilodus lineatus*) foi instalado no CEPTA (Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura) em Pirassununga - SP, onde foram coletadas mais de 68.000 hipófises da mesma espécie com o intuito de possibilitar a reprodução induzida no Brasil (ALCÂNTARA-ROCHA et al., 1989). O desenvolvimento da técnica de hipofisação foi uma tentativa de solucionar o problema de reprodução dos peixes em cativeiro, e mesmo após mais de 80 anos, este método ainda é indicado (NAKAYAMA, 2011). Este método se propagou pelo mundo em decorrência da intensificação da piscicultura, proporcionando o aprimoramento da técnica, com diferentes origens, preparo e purificação do extrato (STREIT JR. et al., 2002). Neste contexto, a busca por alternativas com o objetivo reduzir o custo da hipofisação vem sendo estudada por diversos pesquisadores com a utilização de hipófises provenientes de diferentes origens como de peixes (MARTINS et al., 2008; COLPO et al., 2011); anuros (NWADUKWE, 1993; NAVARRO et al., 2006), aves (AMARAL JR. et al., 1998; YU et al., 1995; SOUZA, et al., 2003) e mamíferos (STREIT JR. et al., 2003; 2004).

Assim, na maioria das pisciculturas utiliza-se extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) devido a facilidade de obtenção e simplicidade da técnica (ANDRADE; YASUI, 2003). A hipofisação é uma técnica muito simples e amplamente utilizada (DONALDSON; HUNTER, 1983; BALDISSEROTTO, 2013), na qual utilizam-se hipófises frescas ou dessecadas, e não necessita de refrigeração. O cálculo da dosagem é baseado na relação entre o peso

corporal do receptor e do extrato de hipófise (VENTURIERI; BERNARDINO, 1999). Além disso, a presença de outros hormônios pode contribuir para um efeito sinérgico na indução hormonal (VENTURIERI; BERNARDINO, 1999).

O EBHC é obtido de uma espécie exótica *Cyprinus carpio*, um produto importado, de alto custo e comercializado em moeda internacional (STREIT JR. et al., 2003; MURGAS et al., 2012). Assim, considerando o preço elevado somado a sua falta no mercado devido à época do ano, é fundamental encontrar outros meios de obtenção de hormônios a fim de superar este problema (SOUZA et al., 2003). Deste modo, é essencial buscar possibilidades que garantam a minimização dos custos produtivos dos alevinos contribuindo com o aumento do retorno financeiro dos produtores, mantendo a qualidade do produto e sua maior eficiência (MOULIN, 2011).

1.4. Caracterização da espécie: *Astyanax altiparanae*

Entre as espécies cultivadas no Brasil está *Astyanax altiparanae*, conhecido como lambari-do-rabo-amarelo, peixe de pequeno porte pertencente à família Characidae e subfamília Tetragonopterinae encontrado na Bacia do Alto Rio Paraná (GARUTTI; BRITSKI, 2000). Este pequeno peixe pode atingir 60 gramas e 10 a 15 cm de comprimento (PORTO-FORESTI et al., 2018).

O cultivo do lambari está aumentando nos últimos anos, visto que em 2017 atingiu a produção de 554 mil toneladas, com um aumento de 135% em relação ao ano de 2016. Neste cenário, a expansão em sua produção superou a espécie mais cultivada no país, a tilápia, que cresceu apenas 18,5% no mesmo ano (IBGE, 2017). Dentre os estados brasileiros produtores de lambari, São Paulo lidera com de 80% em sua produção, seguido por Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Santa Catarina que também apresentam ritmo de crescimento acelerado (SUSSEL, 2017).

Esta espécie pode ter diversas finalidades com a utilização de isca viva na pesca esportiva ou lazer, como peixe forrageiro para espécies carnívoras como dourado, tucunaré e corvina; em menor escala é usado no aquarismo, como peixe ornamental, na alimentação como fonte de proteína animal com boa aceitação (GARUTTI, 2003) e consumido como petisco, com potencial de comercialização no mercado de enlatados (FERREIRA et al., 2014). Assim, o

cultivo do lambari torna-se uma boa alternativa para a piscicultura no Brasil (SALARO et al., 2015).

A. altiparanae por ser uma espécie rústica e pequena apresenta vantagens como rápido ciclo reprodutivo em torno de 5 meses e alta produtividade quando cultivado em sistema intensivo (GARUTTI, 2003) apresentando um bom desempenho zootécnico e baixo índice de mortalidade (NAVARRO et al., 2006). Desta forma, pode ser utilizado como modelo biológico (SIQUEIRA-SILVA et al., 2015; 2019; DOS SANTOS et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2017; EVANGELISTA et al., 2019; PEREIRA et al., 2019) e devido ao seu pequeno tamanho, futuros estudos podem ser aplicados a outras espécies de maior porte (GONÇALVES et al., 2014).

Em relação a sua reprodução, *A. altiparanae* apresenta um longo período reprodutivo e com desova parcelada (CHEHADE et al., 2015; LIRA et al., 2018) e segundo Agostinho et al. (1984) a maturação dos ovários se inicia no inverno e o período de desova ocorre de novembro a fevereiro, contudo, outros autores ainda relatam que sua reprodução se prolonga da primavera até o verão (GARUTTI; BRITSKI, 1997).

Desta forma, considerando que podemos encontrar indivíduos aptos à desova durante boa parte do ano, e de acordo com Porto-Foresti et al. (2018) esta espécie ainda pode apresentar de 3 a 4 desovas ao ano, destacamos a facilidade de obtenção das hipófises para utilização na indução hormonal. Assim a coleta das hipófises no período reprodutivo pode maximizar o sucesso na reprodução, já que de acordo com Woynarovich e Horváth (1983) os níveis de gonadotropinas atingem seu ápice no momento que precede a desova.

2. Objetivo geral:

- Testar o uso do extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* (EBHL) na reprodução induzida de *A. altiparanae* e *Prochilodus lineatus*;

Objetivos específicos:

- Avaliar o extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ), e comparar as características

reprodutivas das fêmeas doadoras para definir se existe um período para coleta das hipófises e estabelecer um protocolo de coleta de EBHL;

- Estudar o potencial indutor de EBHL considerando as concentrações de MIS e outras variáveis de desempenho reprodutivo em fêmeas de *A. altiparanae*;
- Estudar o potencial indutor de EBHL considerando o desempenho reprodutivo em fêmeas de *P. lineatus*.

3. Justificativa do projeto

Nosso estudo teve como objetivo uso de EBHL como indutor de desova em peixes nativos, como alternativa ao método de hipofiseção com EBHC. Dentre as inúmeras vantagens podemos ressaltar a baixa exigência de espaço para criação, que diminui o investimento em infraestrutura bem como o tempo de estocagem dos animais, pois sua maturação ocorre em torno de 5 meses em comparação a carpa, que é uma espécie exótica, alcança maturação sexual após 4 anos de idade. Desta forma, também destacamos a geração de renda extra aos produtores, considerando a grande ascensão do cultivo do lambari nos últimos dez anos (136%). Assim, os resultados obtidos podem ser empregados em futuros estudos a espécies de maior porte, particularmente peixes reofílicos mantidos em cativeiro que geralmente apresentam disfunções reprodutivas. Deste modo, a utilização do EBHL minimizaria a necessidade de importação de EBHC, com melhor aproveitamento do pescado visando a sustentabilidade. Os dados obtidos em nosso estudo, agregam conhecimento à aquicultura, visto que há muitos entraves relacionados a reprodução de peixes migradores devido a disfunções como ausência de maturação final e impedimento na liberação dos gametas, além de ser uma alternativa ao uso de hormônios sintéticos visto que a padronização de protocolos constitui um grande desafio aos pesquisadores.

4. Material e métodos:

- **Manutenção e manejo dos reprodutores:**

Em todos os experimentos foram utilizados fêmeas e machos adultos de *A. altiparanae* e *Prochilodus lineatus* formados a partir de exemplares provenientes de reprodução em cativeiro no Laboratório de Reprodução de

Peixes Nativos do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Caunesp), Jaboticabal, São Paulo, Brasil (21°15'17"S, 48°19'20"W).

Análises físico-químicas da água foram realizadas semanalmente às 07:00 da manhã como pH ($7,1 \pm 0,3$), O_2 ($6 \pm 1,7 \text{ mg.L}^{-1}$), condutividade ($77 \pm 13 \mu\text{S.cm}^{-1}$) e temperatura ($25,9 \pm 0,3^\circ\text{C}$) utilizando pHmetro (Kasvi), oxímetro YSI 550 (Yellow Spring Incorporation) e condutímetro HI98311 (Hanna) (tabela 1).

Os peixes foram arraçoados com ração comercial extrusada para peixes onívoros Nutripiscis® 2,6 mm (36% de proteína bruta) duas vezes ao dia até aparente saciedade. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-012642/17) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Unesp (Jaboticabal, SP, Brasil).

4.1. Experimento 1:

4.1.1. Delineamento experimental:

- a) Análise das características reprodutivas de fêmeas doadoras de hipófises de *A. altiparanae*.

No período de outubro a dezembro de 2016 durante a estação reprodutiva, fêmeas e machos adultos ($n=2500$) foram distribuídos aleatoriamente em 10 viveiros escavados de 81m^3 ($9\text{m} \times 6\text{m} \times 1,5\text{m}$) com densidade de $3,08 \text{ peixes/m}^2$ divididos em 5 viveiros para serem amostrados em outubro e mais 5 viveiros em dezembro ($n= 250$ por viveiro). Os animais foram aclimatados por 17 dias com intervalo de coleta entre os meses de 52 dias e cada viveiro foi considerado como uma unidade experimental (réplica).

Para coletas dos exemplares, fêmeas foram transportadas para o laboratório em caixas com oxigenação e imediatamente anestesiadas e eutanasiadas em solução de benzocaína ($0,1\text{g. L}^{-1}$), então foram aferidos comprimento total ($7,3 \pm 0,7 \text{ cm}$) e massa ($19,1 \pm 4 \text{ g}$).

Assim, 1 fêmea de cada viveiro foi selecionada aleatoriamente por tratamento coletada no mês de outubro ($n=5$) e no mês de dezembro ($n=5$), amostras de sangue foram colhidas dos vasos caudais em seringas heparinizadas, centrifugadas a $1500 \times g$ por 15 min a 4°C , e o plasma foi

armazenado em ultra freezer (-80°C) para análise dos níveis plasmáticos de esteroides sexuais. Os ovários foram coletados por meio de incisão na região ventral, no sentido pôstero – anterior expondo toda a cavidade celomática, então foi aferido a massa para cálculo do IGS (VAZZOLER, 1981; 1996) e coletados os fragmentos ovarianos para análise histológica e densidade volumétrica.

- b) Procedimento para coleta das hipófises de fêmeas doadoras de *A. altiparanae* para indução hormonal da própria espécie.

Nesta segunda etapa foram coletadas 50 hipófises em outubro (extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* em outubro (OUT)) e 50 hipófises em dezembro (extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* em dezembro (DEZ)) de cada viveiro (10 viveiros x 50 indivíduos = 500 fêmeas) com intervalo entre as coletas de 52 dias. Então, as hipófises foram extraídas seguindo protocolo de Woynarovich e Horváth (1983) e preservadas individualmente em solução de acetona, colocadas em um dessecador e armazenadas em vidro âmbar.

Tabela 1. Análise físico-químicas da água dos viveiros.

Experimentos	Temperatura (°C)	Condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	Oxigênio (mg. L^{-1})	pH
1	23 ± 2,8	40,7 ± 2,8	7,3 ± 0,9	6,5 ± 0,1
2	27 ± 0,5	45 ± 2,8	8,6 ± 0,2	6,7 ± 0,1
3	26,1 ± 0,8	23 ± 0,1	6,3 ± 0,1	6,7 ± 0,2
4	26 ± 0,3	36 ± 0,2	7,8 ± 0,2	6,6 ± 0,1
5	22,8 ± 0,7	84,1 ± 4,6	5,8 ± 1,4	6 ± 0,1
6	26,7±0,9	50±1,2	7±1	6,5±0,3

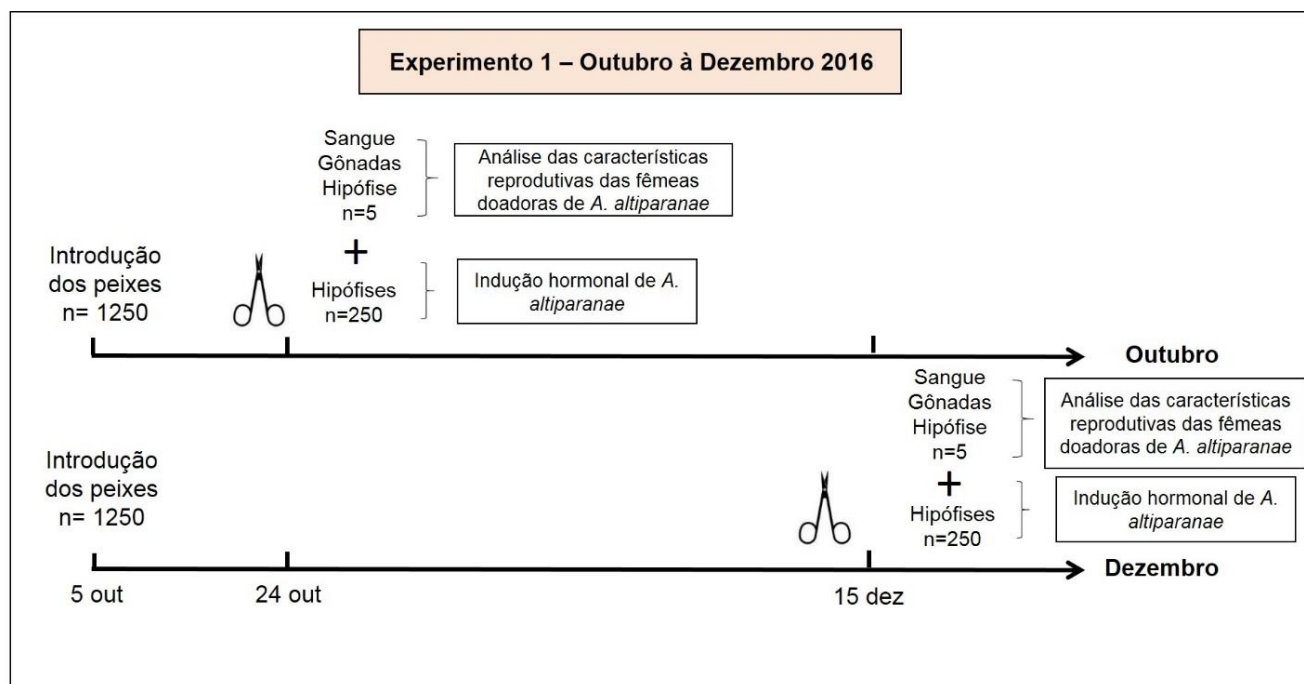


Figura 1. Diagrama para análise das características reprodutivas das fêmeas doadoras de OUT e DEZ no experimento 1 para indução hormonal da própria espécie. **Abreviações:** extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ).

4.2. Experimento 2

4.2.1. Delineamento experimental:

- a) Indução hormonal em fêmeas de *A. altiparanae* com aplicação de dose única.

Este estudo foi realizado em dezembro de 2016, então foram utilizadas 100 fêmeas ($21,8 \pm 4,4$ g) e 200 machos ($12,2 \pm 1,7$ g) distribuídos aleatoriamente em caixas plásticas de 10 litros (30x40 cm) com 5 fêmeas e 10 machos (proporção sexual de 1:2) com fluxo contínuo de entrada e saída de água em sistema seminatural com recirculação fechada e temperatura controlada.

Os exemplares foram divididos em grupos experimentais: dois tratamentos, OUT e DEZ (hipófises obtidas no experimento 1) e dois controles: extrato bruto de hipófise de carpa – controle positivo (CP) e solução salina de 0,9% NaCl – controle negativo (C) (4 grupos (2 tratamentos e 2 controles) x 5 réplicas x 5 fêmeas = 100 fêmeas). Antes da indução hormonal foram coletadas fêmeas (n=6) para comparação dos parâmetros reprodutivos basais denominado como grupo inicial (IN).

Para indução a ovulação foram utilizadas dose única de injeção intraperitoneal de 6 mg. Kg⁻¹ de OUT, DEZ e CP e para o controle C (0,9% NaCl) as 00h00 (figura 2). O CP foi obtido de fornecedores comerciais. Os machos de todos os grupos foram induzidos com 6 mg.kg⁻¹ de CP em dose única.

A partir de 5 horas após a indução hormonal, as réplicas foram monitoradas em intervalos de 30 minutos para observação de desova, quando desovada, aguardado 1:30h foi aferido o volume de ovos e em seguida foram coletados 10mL de ovos e colocados em incubadoras cônicas de 8 litros. Decorrido 3 e 9 horas a partir do momento da desova, uma amostra foi coletada de cada incubadora para o cálculo das taxas de fertilidade e eclosão.

Decorrido este tempo (1:30h) após a indução hormonal foi realizada amostragem de sangue e ovários de uma fêmea desovada e não desovada por réplica (n=10 por grupo) por meio de características externas como ventre flácido. Estas amostragens foram coletadas para análise descrita no item 4.7.

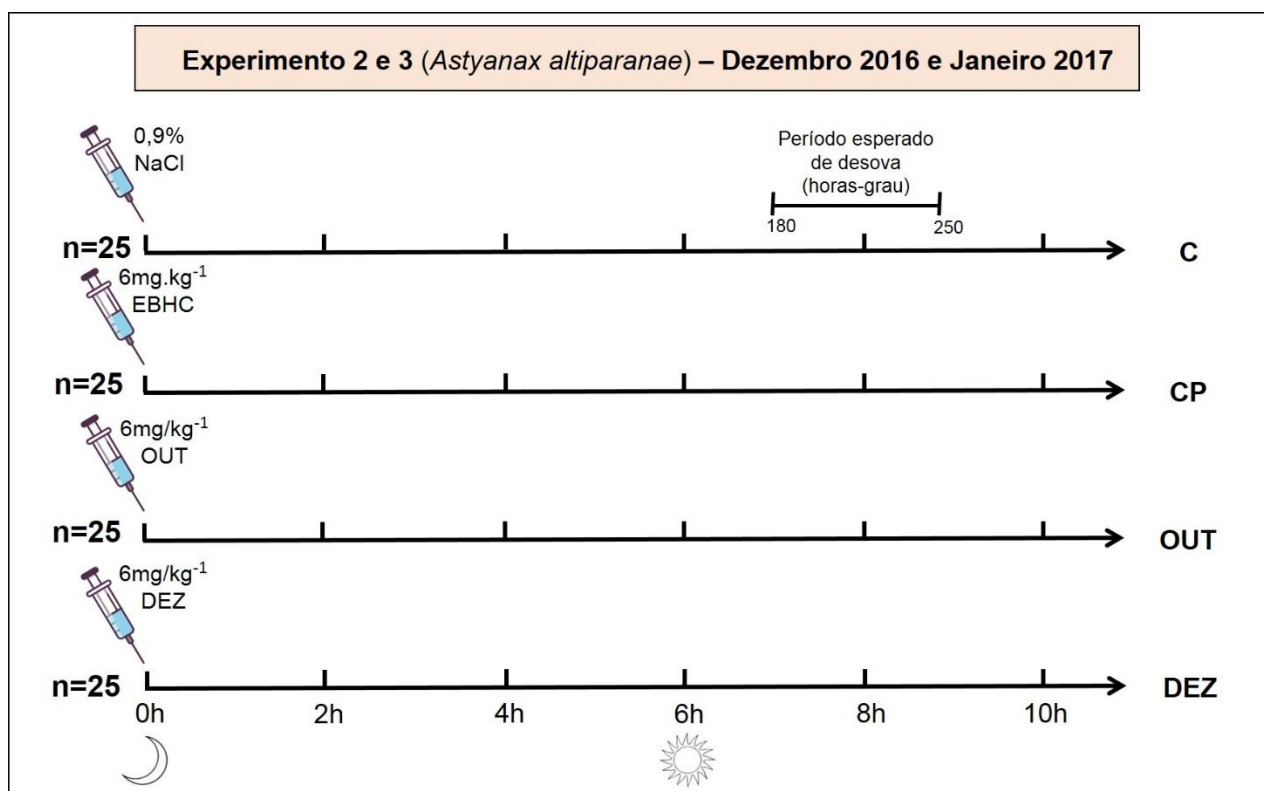


Figura 2. Diagrama de indução hormonal com aplicação de dose única de 6 mg. Kg⁻¹ de OUT, DEZ, CP e C (0,9% NaCl) em fêmeas de *A. altiparanae* nos experimentos 2 e 3. **Abreviações:** extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ), controle positivo (CP) e controle negativo (C).

4.3. Experimento 3

4.3.1. Delineamento experimental:

- a) Indução hormonal em fêmeas de *A. altiparanae* com aplicação de dose única.

Este estudo foi realizado em janeiro de 2017 seguindo o mesmo delineamento do experimento 2, decidimos repeti-lo devido à grande heterogeneidade dos resultados, principalmente dos controles. Então, avaliamos apenas as variáveis de desempenho reprodutivo como período de latência, volume de ovos por réplica, taxa de fertilidade e eclosão. Não foi possível análise estatística devido ao baixo número de fêmeas desovadas (figura 2).

4.4. Experimento 4

4.4.1. Delineamento experimental:

- a) Indução hormonal em fêmeas de *A. altiparanae* com aplicação fracionada de doses.

Este estudo foi realizado em janeiro de 2017 durante a estação reprodutiva, foram utilizadas 125 fêmeas ($16,4 \pm 4$ g) e 250 machos ($10,3 \pm 1,08$ g) distribuídos aleatoriamente em caixa plástica de 10 litros (30 x 40 cm) com 5 fêmeas e 10 machos (proporção sexual de 1:2) com fluxo contínuo de entrada e saída de água em sistema seminatural com recirculação fechada e temperatura controlada.

Os exemplares foram divididos em grupos experimentais: dois tratamentos, OUT e DEZ (hipófises obtidas no experimento 1) e três controles: CP, C e adicionado um mais um controle, controle sem manipulação hormonal (CC), no qual machos e fêmeas não receberam aplicação hormonal, apenas receberam o mesmo manejo e foram alocados nas caixas no mesmo horário dos demais grupos (5 grupos (2 tratamentos e 3 controles) x 5 réplicas x 5 fêmeas = 125 fêmeas). Antes da indução hormonal foram coletadas fêmeas (n=6) para comparação dos parâmetros reprodutivos basais denominado como grupo inicial (IN).

Para indução a ovulação foram utilizadas o fracionamento das doses de injeção intraperitoneal de 0,6 mg. Kg⁻¹ na primeira dose e 5,4 mg. Kg⁻¹ (10% + 90%) de OUT, DEZ e CP e 0,9% NaCl de C com intervalo de 12 horas (11h30

e 00h30) (figura 3). O CP foi obtido de fornecedores comerciais. Os machos de todos os grupos foram induzidos com dose única de 6 mg. Kg⁻¹ de CP no momento da segunda dose das fêmeas, exceto CC.

A partir de 5 horas após a indução hormonal, as réplicas foram monitoradas em intervalos de 30 minutos para observação de desova, quando desovada, aguardado 1:30h foi aferido o volume de ovos e em seguida foram coletados 10mL de ovos e colocados em incubadoras cônicas de 8 litros. Decorrido 3 e 9 horas a partir do momento da desova, uma amostra foi coletada de cada incubadora para o cálculo das taxas de fertilidade e eclosão.

Decorrido em torno de 9 horas (250 horas-grau) após a indução hormonal (Porto-Foresti et al., 2018) foi realizada amostragem de sangue e ovários de uma fêmea desovada e não desovada por réplica (n=10 por grupo) por meio de características externas como ventre flácido. Estas amostragens foram coletadas para análise descrita no item 4.7.

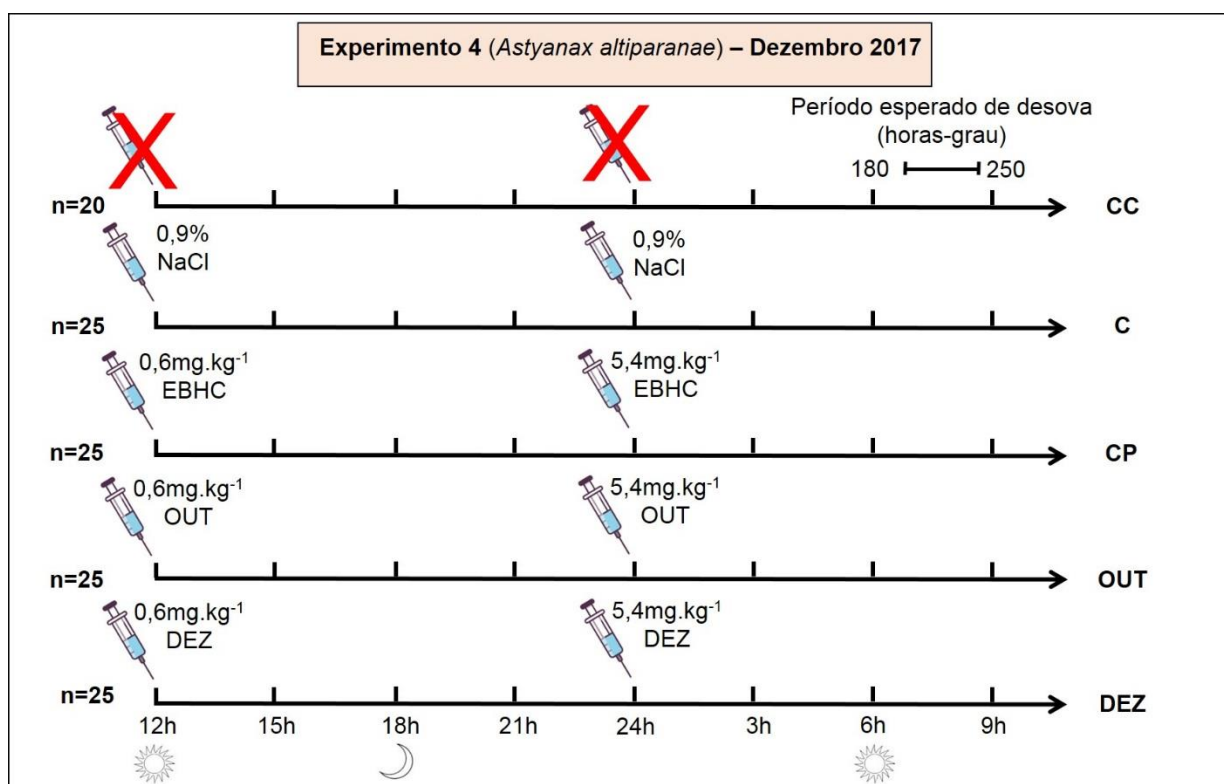


Figura 3. Diagrama de indução hormonal com aplicação fracionada de doses de 0,6 mg. Kg⁻¹ e 5,4 mg. Kg⁻¹ de OUT, DEZ, CP e C (0,9% NaCl) em fêmeas de *A. altiparanae* no experimento 4. **Abreviações:** extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ), controle positivo (CP), controle negativo (C) e controle sem manipulação hormonal (CC).

4.5. Experimento 5:

4.5.1. Delineamento experimental:

- a) Análise das características reprodutivas de fêmeas doadoras de hipófises de *A. altiparanae*.

Em outubro de 2018 durante a estação reprodutiva, fêmeas e machos adultos (n=1250) foram distribuídos aleatoriamente em 5 viveiros (n=250 por viveiro) escavados de 81m³ (9m x 6m x 1,5m) com densidade de 3,08 peixes/m². Os animais foram aclimatados por 25 dias e cada viveiro foi considerado como uma unidade experimental (réplica). Repetimos este experimento, pois as hipófises coletadas do experimento 1 foram esgotadas (figura 4).

Para coletas dos exemplares, fêmeas foram transportadas para o laboratório em caixas com oxigenação e imediatamente anestesiadas e eutanasiadas em solução de benzocaína (1g em 10 L de água), então foram aferidos comprimento total ($12 \pm 1,8$ cm) e massa ($26,7 \pm 6,6$ g).

Assim, 1 fêmea de cada viveiro foi selecionada aleatoriamente por tratamento (n=5), amostras de sangue foram colhidas dos vasos caudais em seringas heparinizadas, centrifugadas a 1500×g por 15 min a 4°C, e o plasma foi armazenado em ultra freezer (-80°C) para análise dos níveis plasmáticos de esteroides sexuais. Os ovários foram coletados por meio de incisão na região ventral, no sentido pôstero – anterior expondo toda a cavidade celomática, então foi aferido a massa para cálculo do IGS (VAZZOLER, 1981; 1996) e coletados os fragmentos ovarianos para análise histológica e densidade volumétrica.

- b) Procedimento para coleta das hipófises de fêmeas doadoras de *A. altiparanae* para indução de *P. lineatus*.

Nesta segunda etapa foram coletadas 50 hipófises (extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT)) de cada viveiro (5 viveiros x 50 indivíduos = 250 fêmeas). E a coleta das hipófises foram realizadas como descrito no experimento 1.

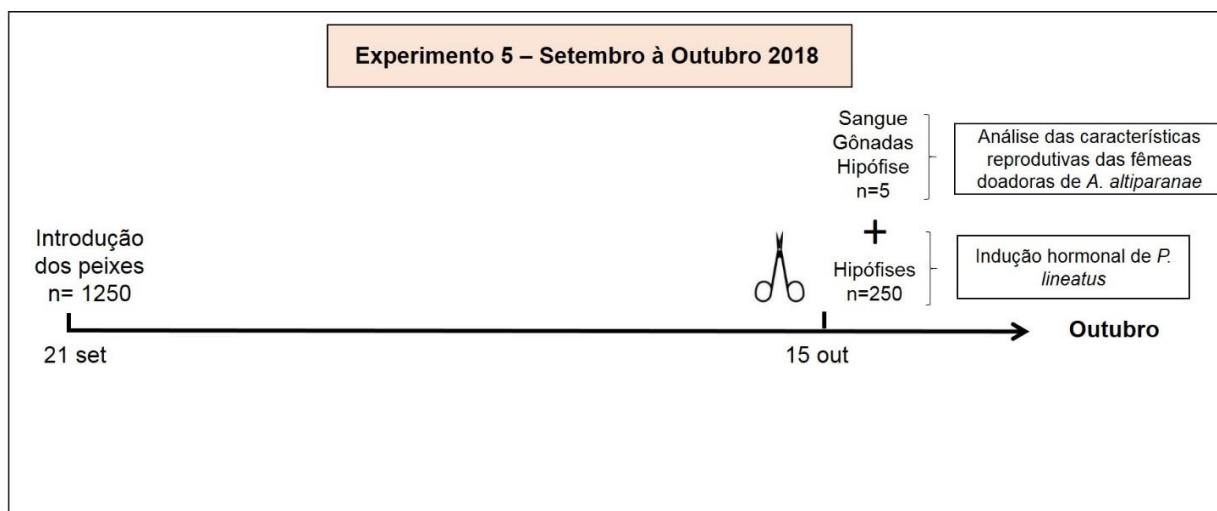


Figura 4. Diagrama para análise das características reprodutivas das fêmeas doadoras de (OUT) para indução hormonal de *P. lineatus* no experimento 6. **Abreviações:** extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletada no mês de outubro (OUT).

4.6. Experimento 6

4.6.1. Delineamento experimental:

- a) Indução hormonal de fêmeas de *P. lineatus* com aplicação fracionada de doses.

Este estudo foi realizado em dezembro de 2018 durante a estação reprodutiva, então foram utilizadas 8 fêmeas e 16 machos adultos distribuídos aleatoriamente em caixas de água de 750 litros com 1 fêmea e 2 machos (proporção sexual 1:2) reproduzidos em sistema seminatural com recirculação fechada com temperatura controlada.

Os exemplares foram divididos em grupos experimentais: um tratamento OUT (hipófises obtidas no experimento 5), um controle CP (2 grupos (1 tratamento e 1 controle) x 3 réplicas x 1 fêmea = 6 fêmeas e controle C (1 grupo x 2 réplicas x 1 fêmea = 2 fêmeas). Então foi utilizado o fracionamento das doses de injeção intramuscular de 0,6 mg. Kg⁻¹ na primeira dose e 5,4 mg. Kg⁻¹ (10% + 90%) de OUT e CP e 0,9% NaCl de C com intervalo de 12 horas (12h30 e 00h30). O CP foi obtido de fornecedores comerciais. Os machos de todos os grupos foram induzidos em dose única de 5,5 mg.kg⁻¹ de CP no momento da segunda dose das fêmeas.

A partir de 5 horas após a indução hormonal, as réplicas foram monitoradas em intervalos de 30 minutos para observação de desova, quando desovada, foi aferido o volume de ovos e em seguida foram coletados 10mL de

ovos e colocados em incubadoras cônicas de 8 litros. Decorrido 3 e 9 horas a partir do momento da desova, uma amostra foi coletada de cada incubadora para o cálculo das taxas de fertilidade e eclosão.

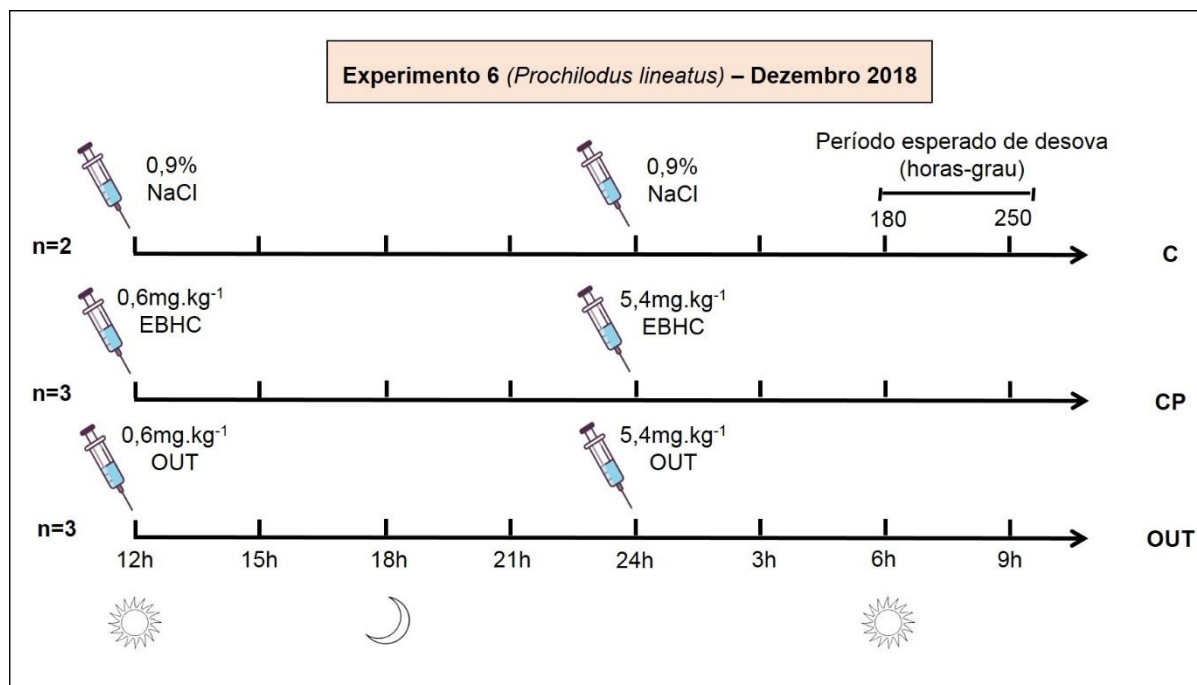


Figura 5. Diagrama de indução hormonal com aplicação fracionada de doses de 0,6 mg. Kg⁻¹e 5,4 mg. Kg⁻¹ de OUT, CP e C (0,9% Na Cl) em fêmeas de *P. lineatus* no experimento 6. **Abreviações:** extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT), controle positivo (CP) e controle negativo (C).

4.7. Análises das amostras:

- **Índice gonadossomático:**

A massa dos ovários foi utilizada para o cálculo do índice gonadossomático (IGS), que determina a relação da massa gonadal com a massa corpórea do animal, indicando seu estágio reprodutivo. Este índice expressa a porcentagem das gônadas em relação à massa corporal, obtido em porcentagem, que é expresso através da massa das gônadas pela massa corpórea [IGS = (massa das gônadas/massa corpórea) x 100] (VAZZOLER,1981; 1996).

- **Hormônios esteroides:**

As quantificações dos níveis plasmáticos de E₂ e 17,20 β-P foi determinado por método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

utilizando kit comercial (DRG International Inc., Springfield, NJ, EUA; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA, respectivamente) seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras foram feitas em duplicata, e as variações limites intraplaca e interplaca dos kits foram no máximo de 20%. A leitura das placas foi feita em leitor de placas Epoch2 (Bio teK Instruments, Inc., Highland Park, Winooski, USA).

- **Histologia:**

Fragmentos de ovários foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen, 0,1M a pH 7,2 (karnovsky) por no mínimo 24 horas. Após a fixação foram desidratados em solução alcoólica, em série crescente de concentração e embebidos em glicol metacrilato (Technovit 7100/historesina), seccionados a 3,0 µm de espessura em micrótomo equipado com navalha de vidro LEICA RM 2245 e corados com hematoxilina e eosina para confecção de lâminas histológicas.

- **Densidade volumétrica:**

Para o cálculo da densidade volumétrica dos ovários foram obtidas fotomicrografias de 3 campos diferentes por lâmina com objetiva de 5x por meio de microscópio modelo DM4000B acoplado a uma câmera de captura de imagens (LEICA Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os estágios de oócitos de cada fêmea foram classificados em: oócito previtelogênico inicial (opi), oócito previtelogênico final (opf), oócito vitelogênico inicial (ovi), oócito vitelogênico final (ovf), oócito com rompimento da vesícula germinativa do inglês “germinal vesicle *breakdown*” (gvbd), folículo pós-ovulatório (fpo), oócito atrésico (at) e tecido intersticial (ti) de acordo com metodologia estabelecida para outras espécies (KURADOMI, FORESTI; BATLOUNI, 2017; DE ALMEIDA et al., 2018; LIRA et al., 2018; HAINFELLNER et al., 2019).

Desta forma, para contagem dos oócitos foi aplicado um *grid* de 352 pontos ou intersecções em cada uma das 3 imagens utilizando o software *Image J* (v 1.46r, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) e assim contabilizados como pontos válidos as intersecções entre as linhas do *grid* que se cruzavam sobre os tipos dos oócitos. As intersecções em pontos inválidos (em branco) ou em estruturas irreconhecíveis devido ao corte ou a disposição

nas bordas da imagem foram classificadas como artefatos, e não foram contabilizados no cálculo das frequências. O cálculo para cada animal foi realizado da seguinte forma: (nº pontos / total de pontos* 100). Nesta análise separamos os resultados entre fêmeas desovadas e não desovadas.

- **Desempenho reprodutivo:**

Para o cálculo do desempenho reprodutivos determinamos as seguintes variáveis (tabela 2).

Tabela 2. Cálculo das variáveis de desempenho reprodutivo.

Variáveis	Cálculo
Horas-grau	HG= somatória da temperatura medida a cada hora
Taxa de desova	TD= número total de réplicas desovadas/ número total de réplicas por grupo
Número de fêmeas desovadas por réplica	TD= número de fêmeas desovadas/ número total de fêmeas por réplica
Volume de ovos por réplica	V=volume total de ovos em cada réplica
Fecundidade relativa média	FR = volume total de ovos/ soma total de massa das fêmeas desovadas por grupo
Taxa de fertilidade	TF = número de ovos viáveis x 100/ número total de ovos
Taxa de eclosão	TE = número de larvas eclodidas x 100/ número total de ovos
Número de embriões viáveis	N= volume de desova x taxa de eclosão x 720 ovos por mL.

4.8. Análise dos dados:

O delineamento dos experimentos foi inteiramente casualizado com 2 grupos (experimento 1), 4 grupos (experimentos 2 e 3), 5 grupos (experimento 4) e 3 grupos (experimentos 6). Os dados foram submetidos a pressupostos de homocedasticidade e normalidade por Teste de Levene e Shapiro Wilk,

respectivamente. Para as análises foi utilizado software Statistica 6.0. com o nível de significância $\alpha=0,05$.

Para comparação de dois grupos foi aplicado teste T (dados paramétricos) e teste Man U Whitney (dados não paramétricos) e para comparação múltipla foi aplicado análise de variância – ANOVA (dados paramétricos) seguido por teste Tukey HSD e Kruskal Wallis (dados não paramétricos). Os dados foram representados por média e desvio padrão quando paramétricos e por mediana, primeiro e terceiro quartil quando não paramétricos. Os grupos foram divididos em fêmeas desovadas e não desovadas.

No experimento 1, níveis plasmáticos de $17,20\beta$ -P e densidade volumétrica dos oócitos foram analisados por teste Man U Whitney e os níveis plasmáticos de E_2 foram analisados por teste T.

No experimento 2, a densidade volumétrica dos oócitos e IGS foram analisados por teste Kruskal Wallis. Fêmeas desovadas não foram analisadas estatisticamente pelo baixo número de exemplares.

No experimento 4, o desempenho reprodutivo e densidade volumétrica dos oócitos de fêmeas desovadas e não desovadas nos grupos experimentais foram analisados por teste Kruskal Wallis, já para comparação da densidade volumétrica de fêmeas desovadas e não desovadas dentro dos grupos foram analisados por teste Man U Whitney. Os níveis de $17, 20 \beta$ -P e IGS foram analisados por ANOVA seguido por teste Tukey HSD.

No experimento 5 e 6, os grupos não foram analisados estatisticamente pelo baixo número de exemplares.

5. Resultados

5.1. Descrição morfológica dos oócitos de *A. altiparanae*:

Os oócitos previtelogênicos iniciais (opi) foram caracterizados pelo citoplasma basófilo, núcleo acidófilo e os nucléolos posicionados na região periférica do núcleo. As células foliculares são pavimentosas e os oócitos ainda não atingiram seu máximo crescimento (figura 6a). Já os oócitos previtelogênicos finais (opf) tornam-se maiores do que o estágio anterior, apresentam núcleo central e os nucléolos estão mais dispersos no núcleo. As

células foliculares permanecem pavimentosas, e neste estágio ocorre o aparecimento dos alvéolos corticais e surgimento da zona radiata (figura 6b).

Nos oócitos vitelogênicos iniciais (ovi) observamos a presença dos alvéolos corticais na periferia e agora, aparecem os grânulos de vitelo. Também notamos a presença da zona radiata e as células foliculares permanecem pavimentosas (figura 6c). Oócitos vitelogênicos finais (ovf), o citoplasma é completamente ocupado pelos grânulos de vitelo, e os alvéolos corticais permanecem na periferia. A zona radiata torna-se mais espessa e as células foliculares permanecem pavimentosas (figura 6d).

Oócitos com migração e rompimento da vesícula germinativa (gvbd) foram classificados pelo rompimento da vesícula germinativa então todo material nuclear está disperso no citoplasma. Os alvéolos corticais continuam na periferia, a zona radiata atinge sua máxima espessura assim como os oócitos alcançam seu máximo crescimento. É neste estágio que os oócitos estão em maturação final e estão prontos para fertilização (figura 6e).

Os oócitos atrésicos (at) foram caracterizados pela desorganização do citoplasma, observamos a zona radiata toda descontínua entremeada pelos grânulos de vitelo e alvéolos corticais. As células foliculares são pavimentosas. Esta atresia pode ocorrer em qualquer momento do ciclo reprodutivo, por fatores ambientais ou fisiológicos não foram oocitados (figura 6f)

Os folículos pós ovulatórios (fpo) são estruturas remanescentes que permanecem nos ovários após a oocitação, então notamos a presença apenas das células foliculares e camadas da teca. (figura 6g). E o tecido intersticial é composto por vasos sanguíneos, são tecidos de sustentação que envolvem todo o ovário emitindo projeções, as lamelas ovulíferas que dão suporte ao desenvolvimento dos oócitos (figura 6h).

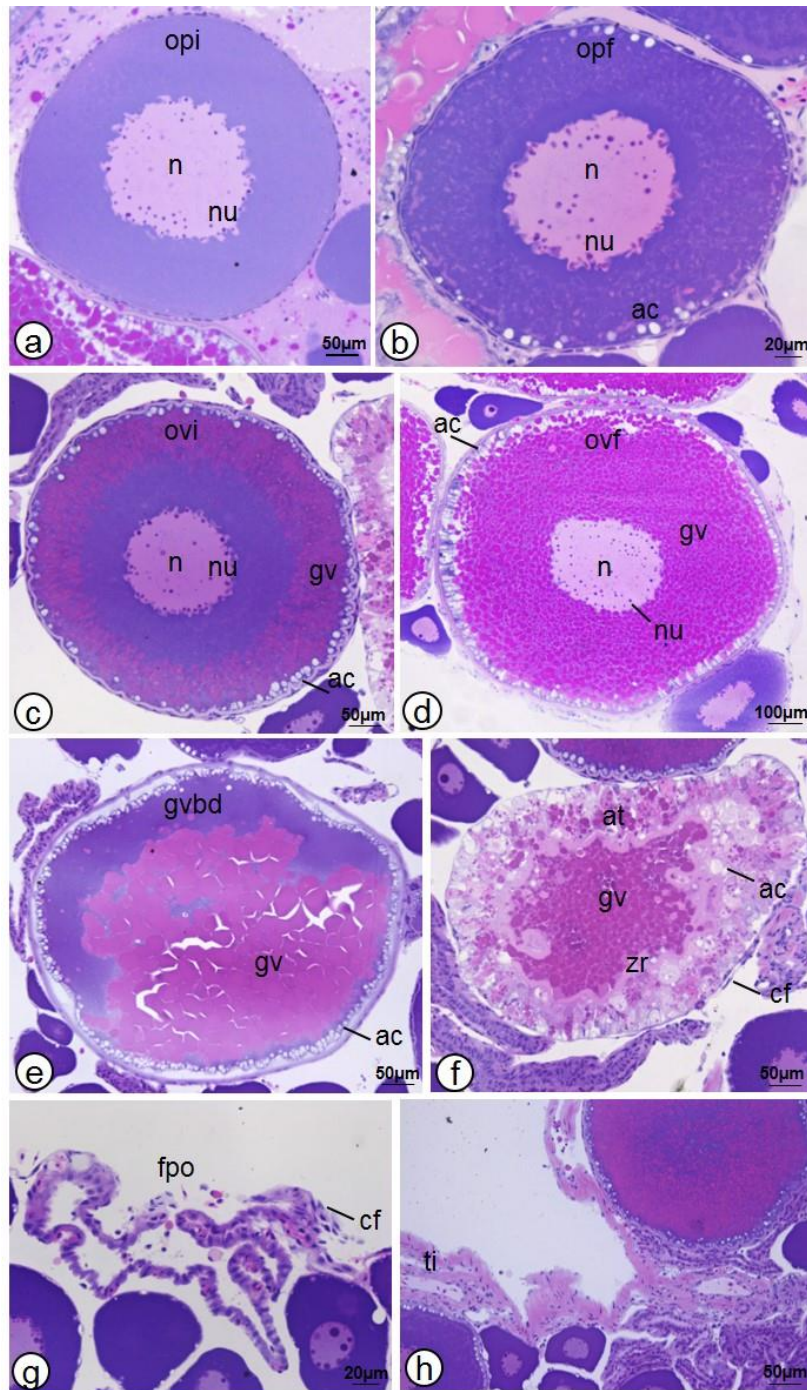


Figura 6. Oogênese em *A. altiparanae*. a) oócito previtelogênico inicial (opi) com nucléolos (nu) dispostos na periferia do núcleo; b) oócito previtelogênico final (opf) com aparecimento dos alvéolos corticais (ac); c) oócito vitelogênico inicial (ovi) caracterizado pelo surgimento dos grânulos de vitelo (gv); d) oócito vitelogênico final (ovf) com ocupação dos grânulos de vitelo (gv) por todo citoplasma; e) oócito com rompimento da vesícula germinativa (gvbd) em todo citoplasma; f) oócito atrésico (at) com zona radiata irregular (zr) e camada folicular descontínua (cf); g) folículo pós ovulatório destacando as estruturas remanescentes dos ovários após a oocitação: camadas da teca e foliculares (cf); h) tecido intersticial (ti) tecido conjuntivo que reveste os ovários dando suporte ao longo de todo desenvolvimento dos oócitos. Coloração: hematoxilina/eosina.

5.2. Experimento 1: Análise das características reprodutivas das fêmeas doadoras de hipófises de *A. altiparanae*.

O IGS foi similar entre os meses ($p>0,05$) assim como os níveis plasmáticos de E_2 e $17, 20 \beta\text{-P}$ ($p>0,05$) (tabela 3). As densidades volumétricas ocupadas pelos diferentes oócitos foram similares entre OUT e DEZ ($p>0,05$) (figura 7). Observamos que em ambos os meses, a maioria dos oócitos foram classificados como vitelogênicos finais. Não encontramos folículos pós-ovulatórios, nem oócitos com migração e rompimento da vesícula germinativa (figura 7).

Tabela 3. Comparação de IGS (%), dos níveis plasmáticos de E_2 (ng. mL⁻¹), $17,20 \beta\text{-P}$ (ng. mL⁻¹) em fêmeas doadoras de hipófises de *A. altiparanae* nos meses de outubro (OUT) e dezembro (DEZ) no experimento 1.

MESES	IGS (%)	E_2 (ng. mL ⁻¹)	$17,20\beta\text{-P}$ (ng. mL ⁻¹)
OUT	$15,7 \pm 3,4^a$	$0,96 \pm 0,27^a$	$0,21 \pm 0,08^a$
DEZ	$15,5 \pm 6^a$	$1,33 \pm 0,38^a$	$0,24 \pm 0,09^a$

** Os grupos foram analisados por Teste T ($p>0,05$) e os dados foram representados por média e desvio padrão (n=10).

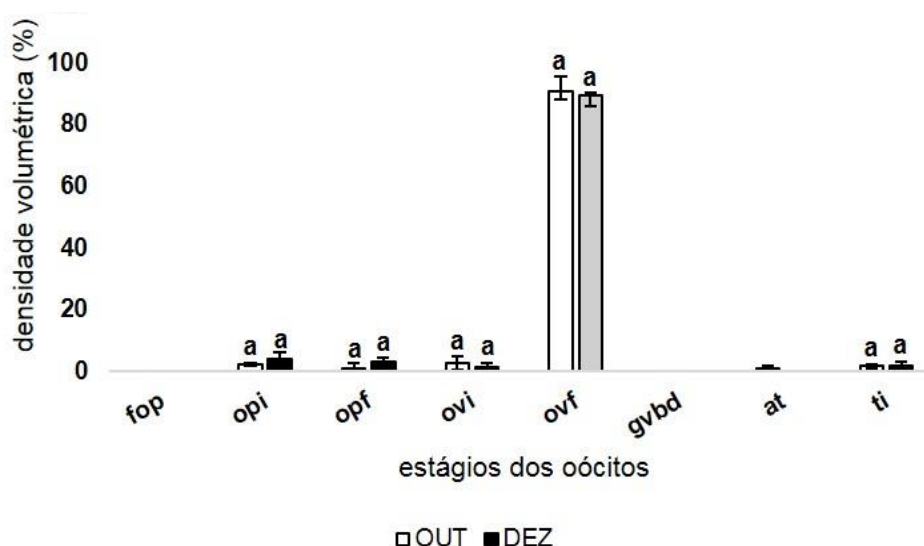


Figura 7. Densidade volumétrica dos oócitos em fêmeas doadoras de *A. altiparanae* classificados nos diferentes estágios de desenvolvimento nos meses outubro (OUT) e dezembro (DEZ) no experimento 1. Abreviações: fop (folículo pós-ovulatório); opi (oócito previtelogênico inicial); opf (oócito previtelogênico final); ovi (oócito vitelogênico inicial); ovf (oócito vitelogênico final); gvbd (oócito com rompimento da vesícula germinativa); at (oócito atrésico) e ti (tecido intersticial). Os grupos foram analisados por Teste Man U Whitney ($p<0,05$). Os dados foram representados por mediana, primeiro e terceiro quartil (n= 10).

5.3. Experimento 2: Indução hormonal em fêmeas de *A. altiparanae* com aplicação de dose única.

5.3.1. Índice gonadossomático (IGS):

Não foi possível a análise estatística no grupo de fêmeas desovadas devido ao baixo número de animais desovados. Entre fêmeas não desovadas, o IGS apresentou resultados similares entre os grupos experimentais ($p>0,05$) (figura 8).

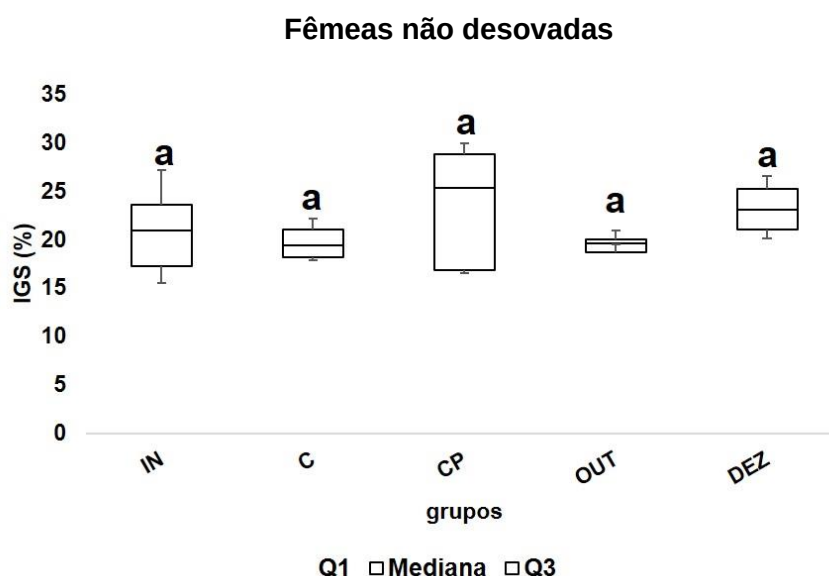


Figura 8. Índice gonadossomático (IGS) em fêmeas não desovadas ($n=24$) de *A. altiparanae* no experimento 2. **Abreviações:** grupo inicial (IN), controle negativo (C), controle sem manipulação (CC), controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari de *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari de *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ). Os grupos foram analisados por teste Kruskal Wallis ($p<0,05$) e os dados foram representados por mediana, primeiro e terceiro quartil.

5.3.2. Desempenho reprodutivo:

O período de latência dos grupos se iniciou em torno de 156,6 e se estendeu 279,7 horas-grau (tabela 4). Os tratamentos promoveram a ovulação, OUT promoveu desova em duas réplicas (40%), enquanto DEZ em apenas uma réplica (20%). A taxa de fertilidade foi superior a 43% (tabela 4). Não foi possível a comparação por análise estatística entre os grupos devido ao baixo número de réplicas desovadas.

Tabela 4. Desempenho reprodutivo com dose única de 6mg.Kg^{-1} de OUT, DEZ, CP e C (0,9%NaCl) em fêmeas de *A. altiparanae* no experimento 2. **Abreviações:** controle negativo (C), controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ).

Grupos	Horas grau	Taxa de desova	VOLUME	Taxa de fertilidade (%)	Taxa de eclosão (%)
			de ovos por réplica (mL)		
C	208,8	20%	20	85,6	97,1
CP	279,7	40%	17	51,1	55,3
	232,2		12	5	7,56
OUT	182,7	40%	56	43,1	48,9
	156,6		45	51	7,7
DEZ	156,6	40%	42	46,1	53,7

5.3.3. Densidade volumétrica:

No grupo IN, a maioria dos oócitos foram classificados como vitelogênicos finais não observamos folículos pós ovulatórios nem oócitos com gvbd (tabela 5).

Entre as fêmeas desovadas observamos a presença de folículos pós ovulatórios em todos os grupos assim como oócitos em gvbd, exceto em uma réplica do controle e um tratamento, C e OUT, respectivamente (tabela 5). Não foi possível a comparação entre os grupos devido ao baixo número de réplicas desovadas.

No grupo de fêmeas não desovadas, observamos oócitos vitelogênicos finais em todos os grupos; e oócitos com gvbd apenas em CP e OUT. Então, a densidade volumétrica ocupada pelos oócitos vitelogênicos finais do grupo IN foi superior ao CP ($p < 0,05$) entretanto ambos foram similares aos demais grupos. Quanto aos oócitos em gvbd, CP foi superior ao grupo IN ($p < 0,05$) contudo foram similares aos outros grupos ($p > 0,05$) (figura 9).

Tabela 5. Densidade volumétrica dos oócitos em fêmeas desovadas de *A. altiparanae* classificados nos diferentes estágios de desenvolvimento induzidas com dose única de 6mg.Kg⁻¹ de CP, OUT, DEZ, C (0,9%NaCl) e IN no experimento 2. **Abreviações:** grupo inicial (IN), controle negativo (C), controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ),

Grupos	Densidade volumétrica (%)							
	fpo	opi	opf	ovi	ovf	gvbd	at	it
IN	0	3,2	0	0	96,7	0	0	0
IN	0	2,4	0,6	1,6	94,8	0	0,4	0
IN	0	3,8	0,8	0	95,2	0	0	0
IN	0	4,0	0	0	95,9	0	0	0
IN	0	0	0	0	97,6	0	2,3	0
IN	0	0	4,9	0	75,9	0	19	0
C	4,9	6,5	0	0,82	0	87,6	0	0
	41,0	26,5	7,09	0	22,47	0	2,8	0
CP	42,0	20,75	14,77	2,6	11,5	8,2	0	0
OUT	48,9	33,3	4,28	4,28	7,65	0	0	1,5
	19,7	18,6	3,6	3,0	13,5	32,7	8,6	0
	13,55	9,2	7,4	0	3,0	66,7	0	0
	13,5	16,2	11,5	0	37,9	18,6	2,0	0
DEZ	17,8	14,5	5,2	0	28,8	33,4	0	0

Fêmeas não desovadas

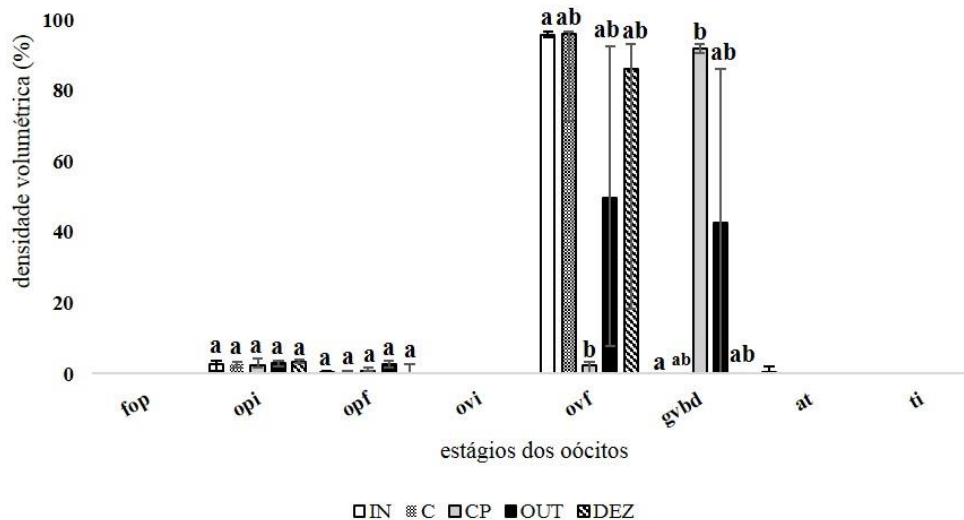


Figura 9. Densidade volumétrica dos estágios dos oócitos em fêmeas desovadas (n=18) e não desovadas (n=18) de *A. altiparanae* no experimento 2. **Abreviações:** grupo inicial (IN), controle negativo (C), controle positivo (CP), controle sem manipulação hormonal (CC), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ); fpo (folículo pós-ovulatório); opi (oócito previtelogênico inicial); opf (oócito previtelogênico final); ovi (oócito vitelogênico inicial); ovf (oócito vitelogênico final); gvbd (oócito com rompimento da vesícula germinativa); at (oócito atrésico) e ti (tecido intersticial). Todos os grupos foram analisados por Kruskal-Wallis, letras iguais não representaram diferença significativa ($p>0,05$) e letras diferentes representaram diferença significativa ($p<0,05$). Os dados foram representados por mediana, primeiro e terceiro quartil.

5.4. Experimento 3 – Indução hormonal em fêmeas de *A. altiparanae* em dose única

5.4.1. Desempenho reprodutivo

O período de latência se iniciou em 150,7 e se estendeu até 341,3 horas-graus. Os tratamentos de OUT e DEZ promoveram a ovulação, em OUT observamos maior taxa de desova 80%, e em DEZ 20% (tabela 6).

Nas taxas de desempenho, OUT teve as maiores taxas de fertilidade e eclosão representando mais de 80%, já os controles C e CP tiveram 70% e 0%, respectivamente, e em DEZ foram maiores de 45% (tabela 6). Não foi possível a análise estatística devido ao baixo número de fêmeas desovadas.

Tabela 6. Desempenho reprodutivo com dose única de 6 mg. Kg⁻¹ de CP, OUT, DEZ e C (0,9% NaCl) em *A. altiparanae* no experimento 3. **Abreviações:** controle negativo (C), controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ),

Grupos	Horas-grau	Taxa de desova	Volume		
			de ovos por réplica (mL)	Taxa de fertilidade (%)	Taxa de eclosão (%)
C	203,9	20%	30	70,4	79,3
CP	261,5	20%	4	0	0
OUT	234,9	80%	35	87,2	72,8
	341,3		4	42,8	29,4
	316,9		36	51,2	41,8
	230,5		14	27	24,9
DEZ	150,7	20%	42	46,1	53,7

5.5. Experimento 4: Indução hormonal em fêmeas de *A. altiparanae* com aplicação fracionada de dose.

5.5.1. Índice gonadosomático (IGS):

No grupo de fêmeas desovadas, o IGS foi maior no grupo IN em relação aos demais grupos ($p < 0,05$) (figura 10A). Não foi possível analisar o controle C devido ao baixo número de fêmeas desovadas. Já entre as fêmeas não desovadas os resultados foram similares ($p > 0,05$) (figura 10B).

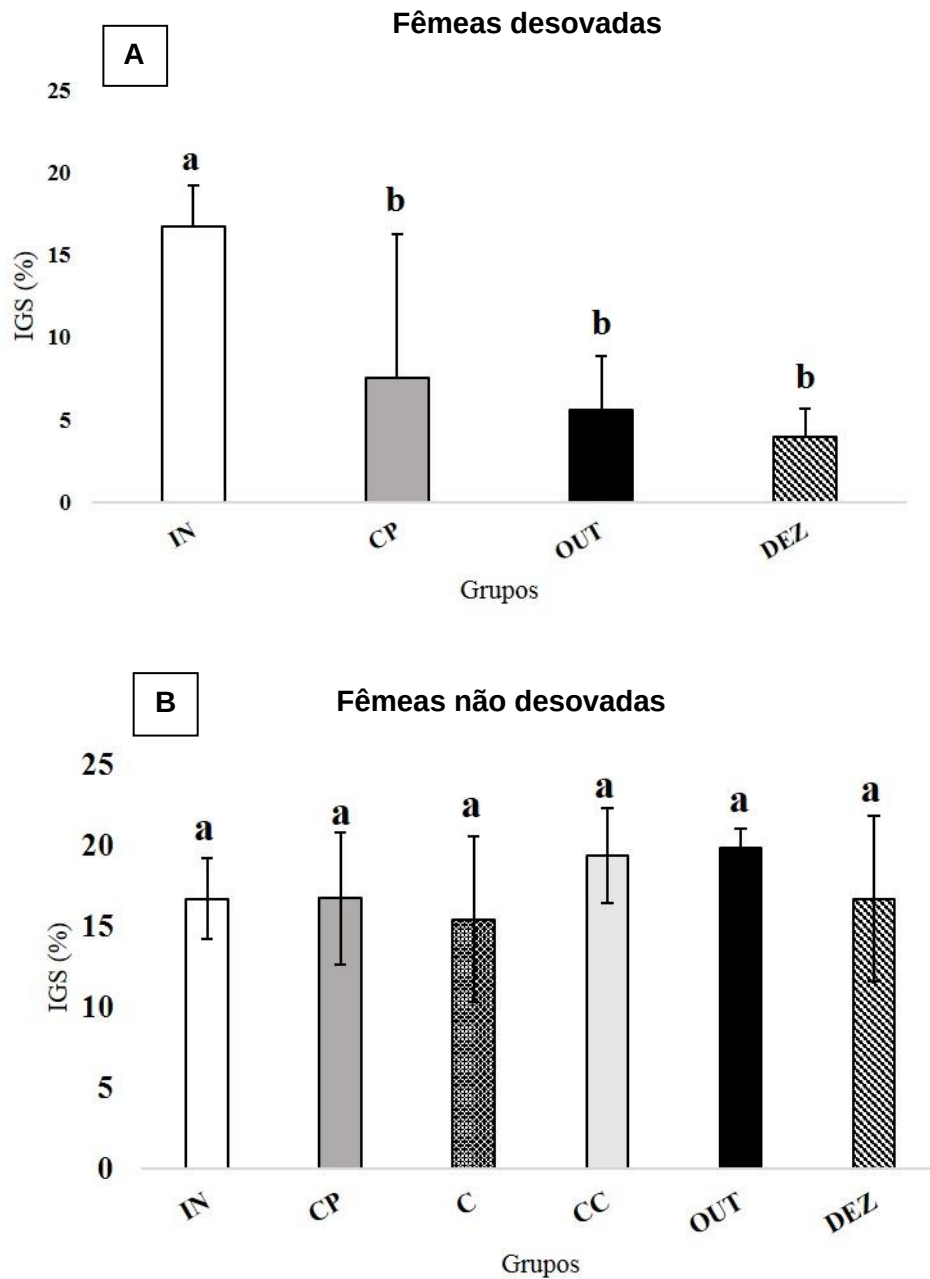


Figura 10. Índice gonadosomático (IGS) em fêmeas de *A. altiparanae* no experimento 4. A) Fêmeas desovadas (n=15). B) Fêmeas não desovadas (n=15). **Abreviações:** grupo inicial (IN), controle positivo (CP), controle negativo (C), controle sem manipulação hormonal (CC), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ). Os grupos foram analisados por One-Way ANOVA ($p > 0,05$) seguido de teste Tukey HSD ($p < 0,05$) e os dados foram representados por média e desvio padrão

5.5.2. Desempenho reprodutivo:

O período de latência se iniciou com 150,7 e se estendeu em média até 177,3 horas-grau (tabela 7). Os tratamentos de OUT e DEZ promoveram a ovulação nas fêmeas induzidas de todas as réplicas (100%), o qual pelo menos uma fêmea por réplica respondeu ao tratamento (tabela 7). O tratamento DEZ teve o maior número de fêmeas desovadas por réplica sendo superior a CC ($p < 0,05$), porém semelhante aos demais. O maior volume médio de ovos foi observado em DEZ. A taxa de fertilidade e eclosão representou pelo menos 50% em todos os grupos, exceto em OUT e DEZ obteve maior número de embriões viáveis.

Tabela 7. Desempenho reprodutivo de fêmeas de *A. altiparanae* induzidas com dose única de 6mg.Kg^{-1} de CP, OUT, DEZ e C (0,9% NaCl) no experimento 4. **Abreviações:** controle negativo (C), controle sem manipulação hormonal (CC), controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ).

Exp. 4 Grupos	Horas-grau	Taxa de desova	Nº de fêmeas desovadas em cada réplica**	Volume de ovos por grupo (ml)	Fecundidade de relativa média	Taxa de fertilidade (%)	Taxa de eclosão (%)	Nº de embriões viáveis
C	150,7	20%	0-0-0-1-1 ^{ab}	20	0,251	73,63	70	10944
CC	-	-	0-0-0-0-0 ^a	-	-	-	-	-
CP	185,8 ± 43,7 ^a	60%	0-0-1-2-2 ^{ab}	24,8 ± 14,5 ^a	0,35 ± 0,2 ^a	74,7 ± 11,7 ^a	74,0 ± 7,5 ^a	13633,9 ± 8409,0 ^a
OUT	189,7 ± 41,2 ^a	100%	1-1-1-2-2 ^{ab}	20,7 ± 8,6 ^a	0,25 ± 0,08 ^a	42 ± 40,5 ^a	41,2 ± 42 ^a	4933,1 ± 771,3 ^a
DEZ	177,3 ± 38,4 ^a	100%	1-2-2-2-3 ^b	34,1 ± 10,8 ^a	0,46 ± 0,13 ^a	73,6 ± 15,3 ^a	65,3 ± 20,3 ^a	16071,2 ± 6610,8 ^a

**Para análise estatística de horas-grau, volume de ovos por grupo, fecundidade relativa média, taxas de fertilidade e eclosão e número de embriões viáveis foram consideradas apenas réplicas desovadas.

5.5.3. Densidade volumétrica nos diferentes grupos:

No grupo IN observamos a maioria dos oócitos em vitelogênese final não observamos oócitos com gvbd nem folículos pós ovulatórios (figura 11A).

No grupo de fêmeas desovadas observamos diferença na densidade volumétrica dos folículos pós ovulatórios em OUT sendo superior ao IN ($p < 0,05$), contudo foram semelhantes aos demais (figura 11A). Os oócitos vitelogênicos finais foram classificados em todos os grupos experimentais, o grupo IN se diferiu estatisticamente dos tratamentos de OUT e DEZ entretanto foi similar a CP ($p < 0,05$). Já quando comparamos os oócitos com gvbd, o tratamento OUT foi diferente dos grupos IN e CP, porém semelhante a DEZ ($p < 0,05$) (figura 11A). O controle C não foi analisado estatisticamente com os outros grupos devido ao baixo número de animais desovados.

Entre fêmeas não desovadas observamos a maioria dos oócitos em vitelogênese final em todos os grupos, não observamos oócitos com rompimento da vesícula germinativa nem folículo pós ovulatório. Não observamos diferença entre os grupos ($p > 0,05$) (figura 11B).

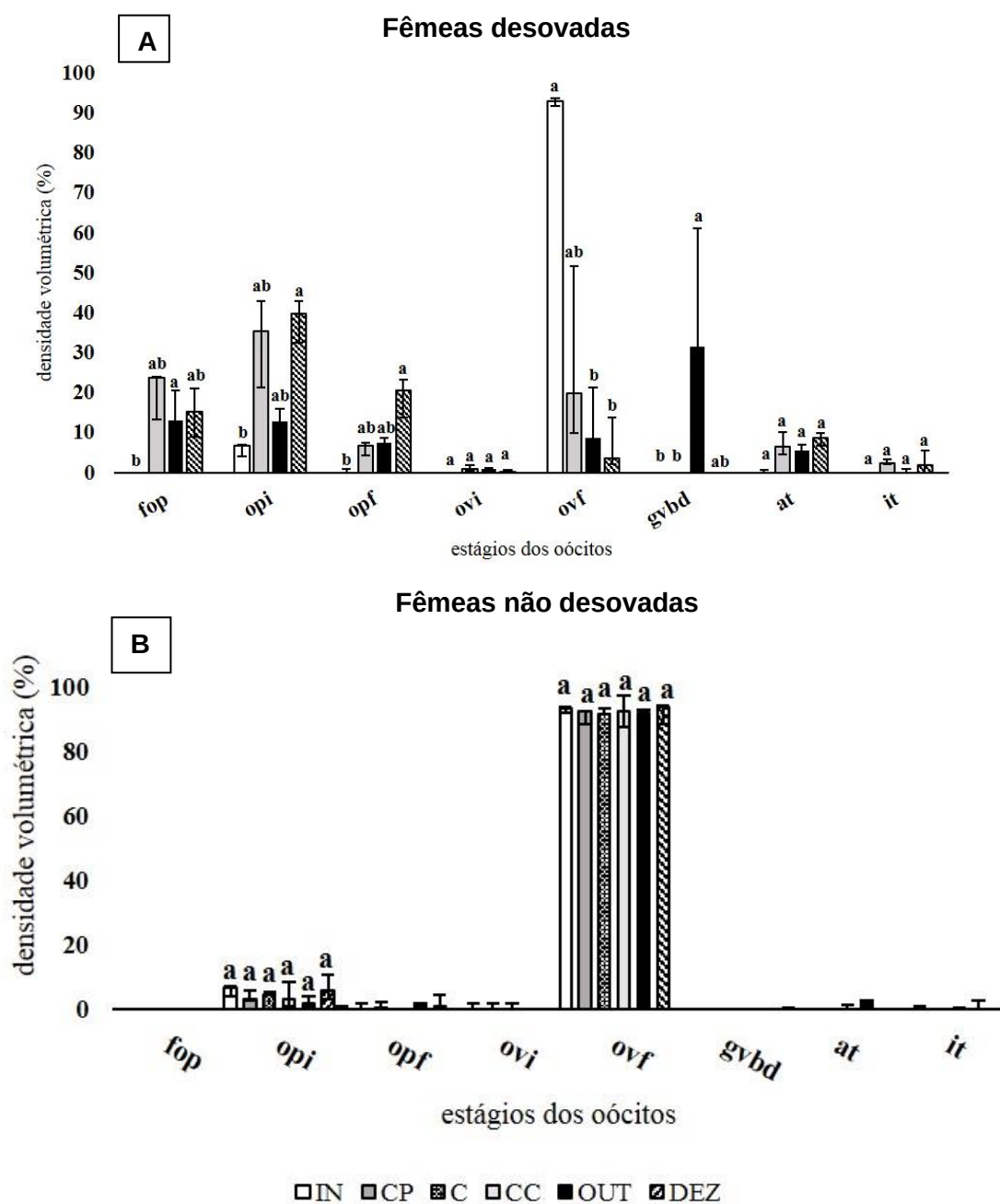


Figura 11. Densidade volumétrica dos estágios dos oócitos em *A. altiparanae* no experimento 4. A) Fêmeas desovadas (n=18); B) fêmeas não desovadas (n=18). **Abreviações:** grupo inicial (IN), controle positivo (CP), controle negativo (C), controle sem manipulação hormonal (CC) extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* em dezembro (DEZ); fpo (folículo pós-ovulatório); opi (oócito previtelogênico inicial); opf (oócito previtelogênico final); ovi (oócito vitelogênico inicial); ovf (oócito vitelogênico final); gvbd (oócito com rompimento da vesícula germinativa); at (oócito atresico) e ti (tecido intersticial). Todos os grupos foram analisados por Kruskal-Wallis, letras iguais não representaram diferença significativa ($p>0,05$) e letras diferentes representaram diferença significativa ($p<0,05$). Os dados foram representados por mediana, primeiro e terceiro quartil.

5.5.4. Densidade volumétrica comparando dentro de cada grupo:

No grupo CP, a densidade volumétrica ocupada pelos folículos pós ovulatórios foi similar entre fêmeas desovadas e não desovadas ($p>0,05$). Entretanto, os oócitos vitelogênicos finais foram superiores em fêmeas não desovadas ($p<0,05$) (figura 12A).

No tratamento de OUT observamos valores superiores na densidade volumétricas dos oócitos vitelogênicos finais sendo superiores em fêmeas desovadas ($p<0,05$) (figura 12B). Também observamos que os folículos pós ovulatórios tiveram densidade volumétrica superior nas fêmeas desovadas ($p<0,05$) (figura 12B).

No tratamento de DEZ observamos que os oócitos vitelogênicos foram superiores em fêmeas não desovadas em comparação com desovadas ($p<0,05$). Já os folículos pós ovulatórios tiveram valores superiores em fêmeas desovadas ($p<0,05$) (figura 12C).

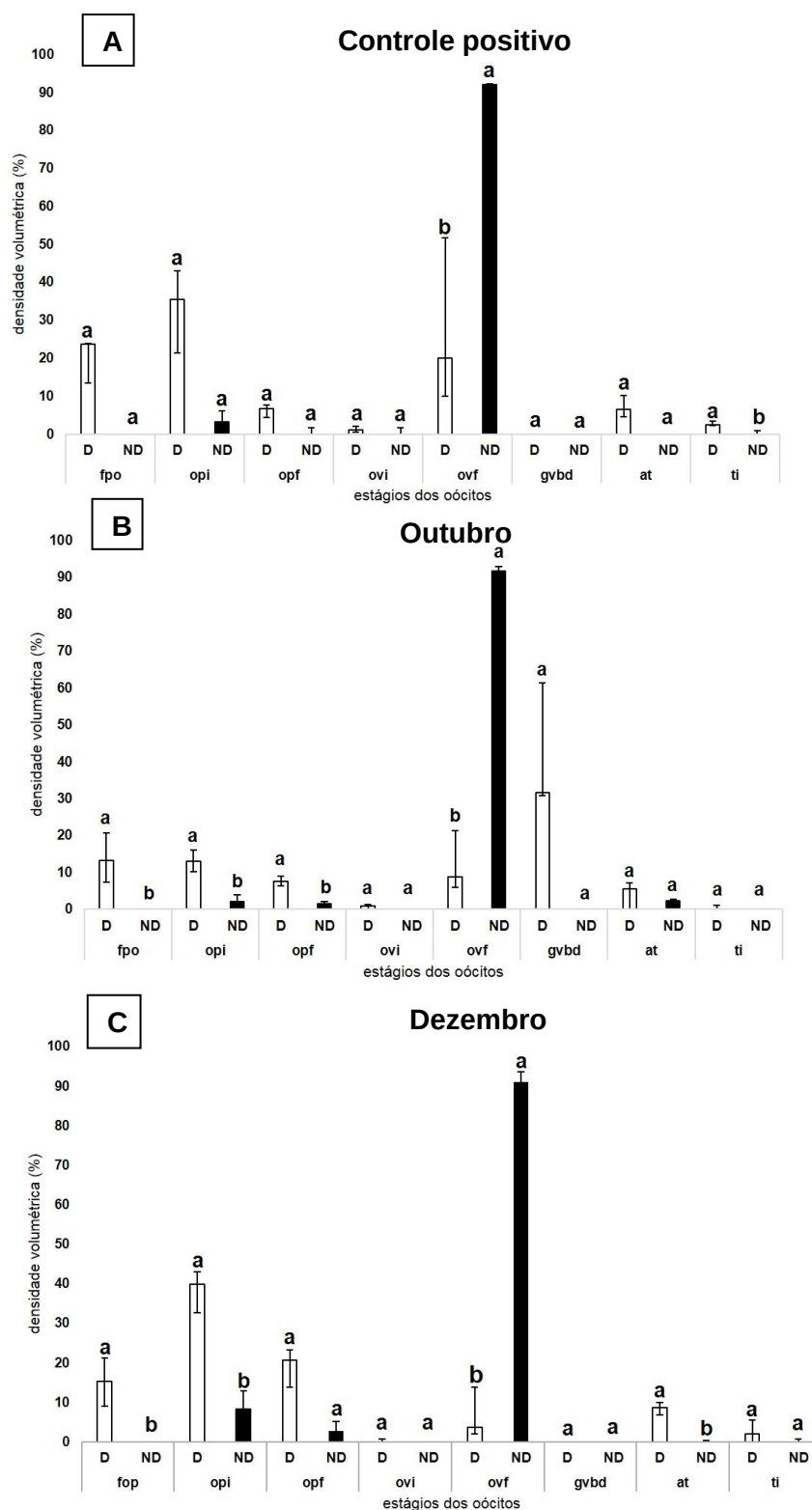


Figura 12. A-C) Comparação da densidade volumétrica dos oócitos em fêmeas desovadas e não desovadas em *A. altiparanae* nos grupos controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e em dezembro (DEZ) no experimento 4. **Abreviações:** fpo (folículo pós-ovulatório); opi (oócito previtelogênico inicial); opf (oócito previtelogênico final); ovi (oócito vitelogênico inicial); ovf (oócito vitelogênico final); gvbd (oócito com rompimento da vesícula germinativa); at (oócito atresico) e ti (tecido intersticial). Os grupos foram analisados por Teste Man U Whitney ($p < 0,05$), letras iguais não representaram diferença ($p > 0,05$) e letras diferentes representaram diferença significativa ($p < 0,05$). Os dados foram representados por mediana, primeiro e terceiro quartil ($n=10$).

5.5.5. Níveis plasmáticos de 17,20 β -P

No grupo de fêmeas desovadas os níveis plasmáticos de 17,20 β -P foram similares entre os diferentes grupos ($p>0.05$) (figura 13A). Já no grupo das fêmeas não desovadas, IN foi inferior aos tratamentos OUT e DEZ ($p<0,05$), porém ambos foram similares aos demais grupos (figura 13B).

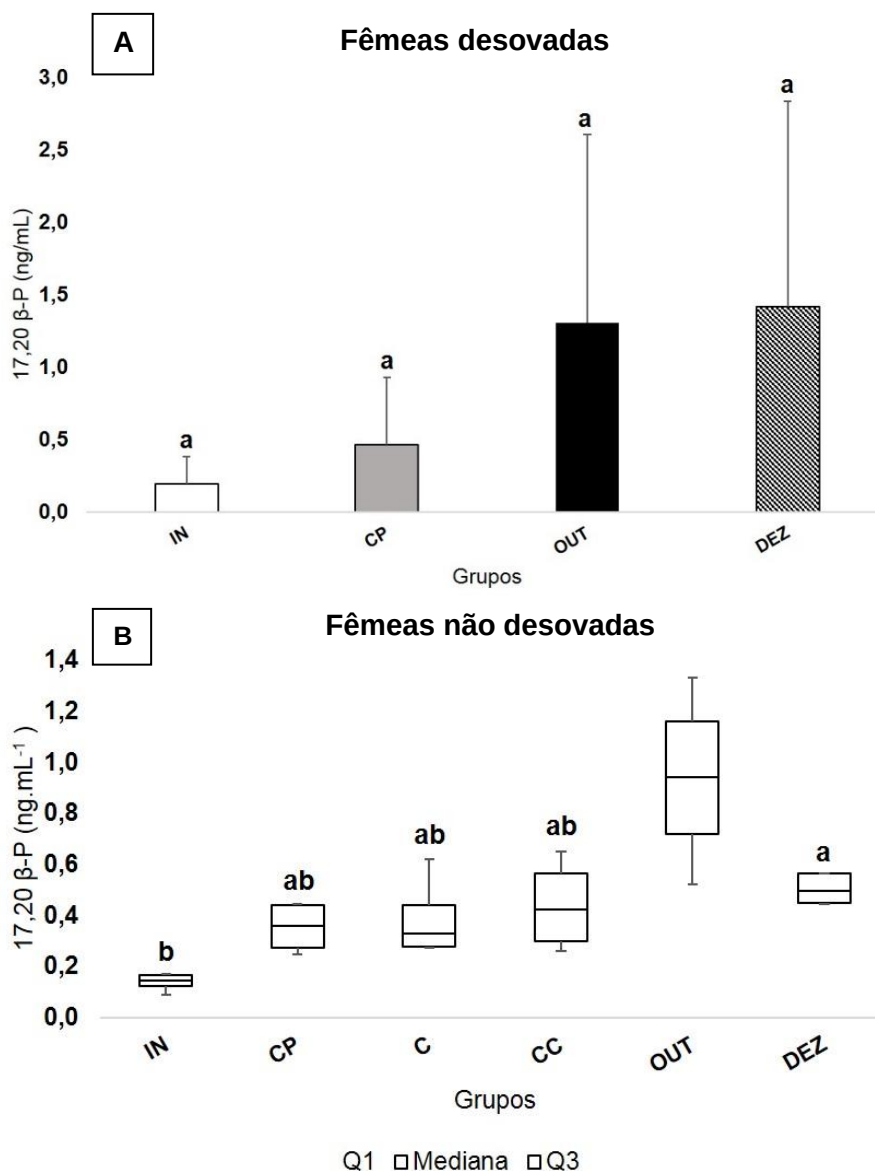


Figura 13. Níveis plasmáticos de 17,20 β -P (ng. mL⁻¹) em fêmeas de *A. altiparanae* no experimento 4. A) Fêmeas desovadas (n=15), os grupos foram analisados por teste Kruskal Wallis ($p<0,05$) e os dados foram representados por mediana, primeiro e terceiro quartil. B) Fêmeas não desovadas (n=26), os grupos foram analisados por One-Way ANOVA ($p>0.05$) seguido por teste Tukey HSD ($p<0,05$) e os dados foram representados por média e desvio padrão. Letras iguais não representaram diferença significativa ($p>0,05$) e letras diferentes representaram diferença significativa ($p<0,05$). **Abreviações:** grupos: inicial (IN), controle negativo (C), controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari em outubro (OUT) e dezembro (DEZ).

5.6. Experimento 5:

- a) Análise das características reprodutivas das fêmeas doadoras de hipófises de *A. altiparanae* para indução hormonal de fêmeas de *P. lineatus*:

Os níveis plasmáticos de E_2 , 17, 20 β -P e IGS foram apresentados na tabela abaixo (tabela 8). A maioria dos oócitos foram classificados como vitelogênicos finais não observamos folículos pós-ovulatórios, nem oócitos com gvbd (figura 14).

Tabela 8. Avaliação de IGS (%), de níveis plasmáticos de E_2 (ng. mL⁻¹) e, 17,20 β -P (ng. mL⁻¹) em fêmeas doadoras de hipófises de *A. altiparanae* no mês de outubro (OUT).

MÊS	IGS (%)	E_2 (ng. mL ⁻¹)	17,20 β -P (ng. mL ⁻¹)
OUT	15,37 $\pm$ 3,51	0,48 $\pm$ 0,15	0,22 $\pm$ 0,13

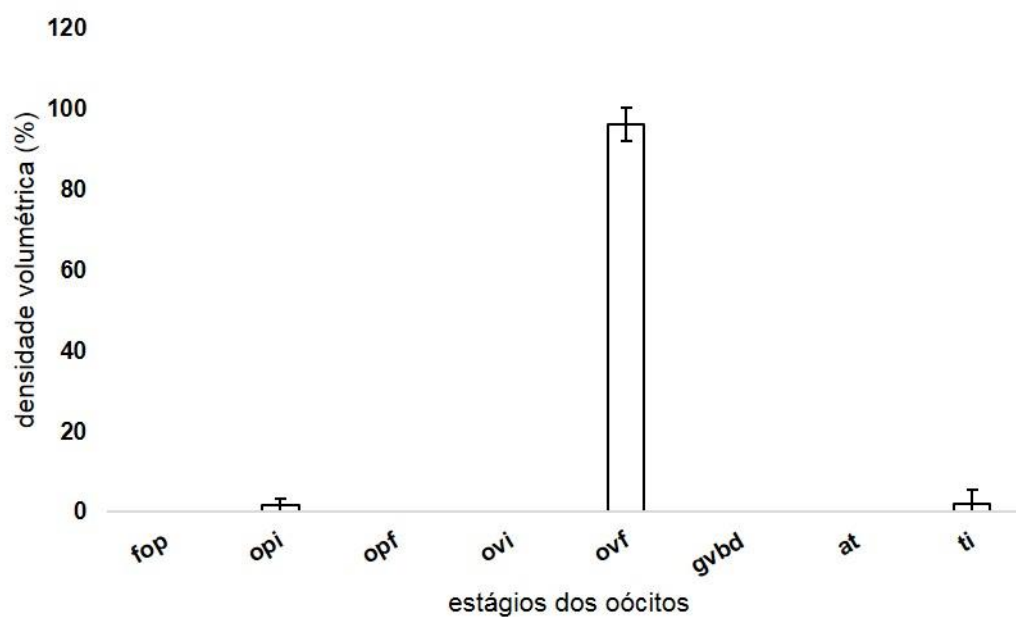


Figura 14. Densidade volumétrica dos oócitos em fêmeas doadoras de *A. altiparanae* (n=5) classificados nos diferentes estágios de desenvolvimento no mês de outubro (OUT) no experimento 5. **Abreviações:** fpo (folículo pós-ovulatório); opi (oócito previtelogênico inicial); opf (oócito previtelogênico final); ovi (oócito vitelogênico inicial); ovf (oócito vitelogênico final); gvbd (oócito com rompimento da vesícula germinativa); at (oócito atrésico) e ti (tecido intersticial). Os dados foram representados por média e desvio padrão.

5.7. Experimento 6 - Indução hormonal em fêmeas em *P. lineatus* com aplicação fracionada de doses.

O período de latência se iniciou em 193,5 e se estendeu até 249,4 horas-grau. Neste estudo observamos que o tratamento OUT promoveu a ovulação nas fêmeas com resposta de duas as réplicas (66,6%) e também de CP (100%), somente o C não desovou (tabela 9). As taxas de desempenho, a fertilidade e eclosão foram maiores do que 80% em uma réplica de OUT e CP, entretanto ambos os grupos também apresentaram réplicas com taxas de 0% (tabela 9).

Tabela 9. Desempenho reprodutivo de fêmeas de *P. lineatus* induzidas com dose fracionada de 6mg.Kg⁻¹ de CP, OUT e C (0,9%NaCl) no experimento 6. **Abreviações:** controle negativo (C), controle positivo (CP) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT).

Experimento 6 Grupos	Resposta à indução hormonal	Horas-grau	Volume de ovos por réplica (L)	Taxa de fertilidade (%)	Taxa de eclosão (%)
C	Não desovada	-	-	-	-
C	Não desovada	-	-	-	-
CP	Desovada	219,3	5,760	7	0
CP	Desovada	193,5	13,333	0	0
CP	Desovada	210,7	8,412	81,2	71,2
OUT	Desovada	227,9	13,225	80,6	51
OUT	Desovada	249,4	7,371	0	0
OUT	Não desovada	-	-	-	-

6. Discussão

A técnica de hipofiseção foi inventada simultaneamente na Argentina com Houssay e no Brasil na década de 30 (MYLONAS; ZOHAR, 2001; ZOHAR; MYLONAS, 2007; ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007). No Brasil, o renomado pesquisador, Von Ihering em 1935, mostrou que a utilização de hipófises provenientes de peixes maduros poderia induzir a desova de outras espécies (ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007; NUNES et al., 2018) assim embora seja uma técnica antiga (decorridos mais de 80 anos) até hoje a hipofiseção ainda é indicada (NAKAYAMA, 2011) e feita com uso de extrato

importado que apresenta elevado custo (R\$1500,00/grama) (STREIT JR. et al., 2003; NAVARRO et al., 2006).

Neste estudo demonstramos que o extrato de hipófise de lambari pode ser usado como indutor a desova de curimatã e intensificar a desova de lambari. Inicialmente no projeto, partimos do princípio que por terem massa inferior a outros peixes, como as carpas, as hipófises de lambari teriam viabilidade apenas para induzir espécies de pequeno porte, como o próprio lambari. Isto porque, para obtenção da quantidade de extrato para induzir peixes maiores, teoricamente muitas hipófises teriam que ser coletadas para aplicar doses efetivas de 6 mg.kg^{-1} em reprodutores de 2 ou 3 kg (pacus e piaçus), por exemplo. Por esta razão, inicialmente tínhamos como objetivo de avaliar o uso de EBHL como indutor de desova da própria espécie, pois por terem massa menor, os lambaris poderiam ser induzidos com quantidades menores de extrato, tornando a técnica viável. Porém duas importantes conclusões deste estudo alteraram o curso inicialmente idealizado tornando necessários testes em outras espécies de desova total, como o curimã.

A primeira delas foi a observação (testes iniciais não descritos aqui) foi que as hipófises de lambari tinham proporcionalmente mais massa. A relação massa de hipófise/ massa corporal é aproximadamente 8 vezes superior no lambari em relação a carpa. Fêmeas de lambari tem massa média de $21,8 \pm 4,4$ gramas (dados deste estudo) e rendem hipófises desidratadas em acetona 0,2mg (1 hipófise) então esta relação seria 0,009 vezes. Uma carpa tem massa média de 2000 gramas e rende uma hipófise seca de 2mg, então esta relação seria 0,001 vezes. Portanto, se eficiente, o EBHL poderia ser usado, e se viável, em espécies de médio porte, como o curimã, que frequentemente tem menos de 1kg (reprodutores) (HAINFELNNER et al., 2012)

A segunda observação foi que os lambaris não são bons modelos para estudo de desempenho reprodutivo, com dose única ou fracionada, pois alguns exemplares do controle negativo desovam sem necessidade de intervenção hormonal trazendo dificuldade para interpretação dos resultados e mesmo nos tratamentos mais eficazes, poucas fêmeas efetivamente desovam. Dessa forma, testando apenas no lambari, não poderíamos avaliar se o extrato induz ou não a desova, mas apenas avaliar se este intensifica ou não em relação ao controle negativo. Estes fatos tomados conjuntamente fizeram com que a

aplicação do extrato em uma espécie de médio porte, cujos controles negativos não desovam, se tornasse a melhor forma de validar nossa hipótese que o EBHL pode ser usado como indutor de peixes migradores nativos.

Com relação ao EBHL, mostramos que é possível obtê-lo com ação indutora de desova mantendo 3,08 peixes/m³ em viveiros escavados de 81m³, por um ou até três meses. Observamos que mantidos nestas condições de 17 a 25 dias de aclimação, a partir do mês de setembro (início da primavera), a coleta de EBHL pode ser realizada (um mês) em OUT ou (três meses) DEZ após o povoamento. Isto porque as características dos reprodutores em ambos os meses foram similares e mostraram que as fêmeas apresentavam cerca de 70% dos ovários ocupados por oócitos vitelogênicos maduros, caracterizando que estavam aptas para desova, ou como descritas em alguns artigos como “gravidas”. Fêmeas maduras ou grávidas sabidamente possuem níveis elevados de esteroides indutores de desova (OGIWARA et al., 2013; OGIWARA; TAKAHASHI, 2017;) e prostaglandinas (CETTA; GOETZ 1982; GOETZ; CETA, 1983; OGIWARA; TAKAHASHI, 2019), ambos produzidos via estimulação por LH. Portanto, apesar de não termos avaliados os níveis de LH no presente estudo, é razoável supor que os níveis de LH também estariam hipoteticamente elevados no EBHL aqui obtido, pois as fêmeas aqui testadas estavam maduras e seu extrato induziu a desova. Assim como o lambari, fêmeas “gravidas” de outras espécies de peixes, com ovulação espontânea, como as trutas (JALABERT; SZÖLLÖSI, 1975; GOETZ; CETTA, 1983) e kinguios (STACEY; PANDEY, 1975) também possuem níveis de PGF e/ou esteroides indutores de desova elevados.

Neste contexto, observamos frequentemente nos viveiros a presença de alevinos indicando que fêmeas desovaram nestas condições, porém recentemente demonstramos que após as desovas as fêmeas de lambari tornam-se aptas a desova novamente cinco dias após a ovulação (LIRA et al., 2018). Estes dados analisados juntamente com fato de não termos encontrado nenhuma fêmea doadora desovada, mas 100% maduras, nos permitem dizer que nosso protocolo foi bem-sucedido em propiciar o extrato em condições de induzir outras espécies a desova, mas não evita que ocasionalmente uma ou outra fêmea desove naturalmente no viveiro. No nosso conhecimento este é o primeiro protocolo para obtenção de extrato bruto de hipófise desta espécie e

possui similaridade com outros protocolos descritos para outras espécies utilizadas no mundo para esta finalidade (COLPO et al., 2011; MARTINS et al., 2008).

Este estudo permitiu também tecer importantes observações em torno da biologia reprodutiva e do desempenho reprodutivo da espécie. Descrevemos de forma inédita que mesmo quando induzidos a desova uma proporção muito baixa de fêmeas desova em unidades de dez litros. Este aspecto ficou bastante claro quando apenas uma dose hormonal foi aplicada. Mesmo este sendo o protocolo mais amplamente usado para indução hormonal de lambaris (SATO et al., 2006; FELIZARDO et al., 2012), inclusive em estudos em nosso laboratório (LIRA et al., 2018; BRAMBILA-SOUZA et al., 2019; FIGUEIREDO-ARIKI, 2019), observamos parâmetros de desempenho reprodutivo similares entre controles negativos, controles positivos e tratamentos. Este aspecto indica que, apesar da grande variação entre fêmeas de um mesmo grupo, que dificulta estabelecer diferenças estatísticas, a espécie desova sem a necessidade de indução hormonal e que a indução hormonal provoca ovulação em apenas 22 de 125 fêmeas injetadas nos controles positivos (no experimento 4).

Por esta razão optamos por fracionar a dose de EBHC baseado em estudos que mostram que um pico de LH só foi obtido em algumas espécies com doses fracionadas (LEVAVI-ZERMONSKY; YARON, 1986; RAHMAN et al., 2001; SENTHILKUMARAN; YOSHIKUNI; NAGAHAMA, 2004; CHAUBE; SINGH; JOY, 2014). Assim, observamos que o fracionamento das doses no experimento 4 diminui um pouco a heterogeneidade de resultados dos experimentos 2 e 3 (dose única) e foi apenas neste experimento que observamos desovas em todos os grupos experimentais, exceto CC. Desta forma, réplicas com desovas foram observadas nos tratamentos OUT e DEZ (100%), CP (60%) e C (40%), entretanto todas as variáveis de desempenho reprodutivo foram similares ($p > 0,05$), com exceção do número de fêmeas desovadas por réplica, no qual observamos que DEZ foi superior a CC ($p < 0,05$). Assim, apenas no experimento com dose fracionada foi possível observar algum ganho no desempenho reprodutivo entre um tratamento e um controle negativo, indicando que assim como para outras espécies (CRISCUOLO-URBINATI et al., 2012; VIVEIROS et al., 2013; KURADOMI;

BATLOUNI; 2018; HAINFELLNER et al., 2012; PEREIRA et al., 2018; SOUZA et al., 2018), a dose fracionada é mais adequada que a dose única para esta espécie.

Porém, ainda neste contexto, mesmo considerando os melhores resultados obtidos com doses fracionadas nos tratamentos com EBHL, o efeito do tratamento hormonal permanece desconhecido, assim como sua biologia reprodutiva. Isto porque, não só pela similaridade no desempenho reprodutivo entre tratamentos e controles negativos, mas também pela similaridade entre níveis de $17, 20\beta\text{-P}$ entre fêmeas desovadas de todos os grupos (controles positivos, negativos e tratamentos). Considerando que o $17, 20\beta\text{-P}$ foi definido como a “esteróide indutor de maturação” (do inglês: *MIS: maturation inducing steroid*) também no lambari (JESUS et al., 2017), uma vez que observamos níveis similares entre os grupos mencionados, torna-se ainda mais difícil compreender o papel e efeito da indução hormonal desta espécie.

A primeira constatação é que aparentemente a manipulação dos peixes pode ter sido responsável pela elevação dos níveis de $17, 20\beta\text{-P}$, pois CC e CP apresentaram valores muito similares em fêmeas não desovadas e desovadas. Diferenças foram encontradas apenas quando analisamos em separado as fêmeas não desovadas e comparamos com o período inicial, certamente porque a retenção da desova manteve níveis superiores destas substâncias em fêmeas grávidas, assim como já descrito para outras espécies (GOETZ; CETTA, 1983). O fato de que a simples manipulação pode elevar os níveis de DHP corrobora estudos anteriores que mostraram que a desova pode ser obtida apenas alterando o volume de água (CHEHADE et al., 2015). Porém, os níveis de $17, 20\beta\text{-P}$ não explicam o ganho no desempenho obtido em alguns tratamentos, pois foram similares entre os grupos. Assim, estudos complementares precisam ser desenvolvidos, definindo novos períodos de coleta e mais grupos experimentais, para termos algum entendimento da biologia reprodutiva desta espécie singular. Ainda assim, destacamos no caso das fêmeas não desovadas, mas tratadas, que apenas os tratamentos com extrato de lambari apresentaram níveis de $17, 20\beta\text{-P}$ no momento da desova superiores ao grupo IN, indicando a possibilidade de o EBHL ser um indutor a desova superior ao CP.

O uso de EBHL foi definitivamente eficaz para indução hormonal de outra espécie nativa *P. lineatus*. Isto porque, os grupos EBHL e CP responderam a indução com 66,6 % e 100% de taxa de desova, respectivamente, mas principalmente porque não observamos desova no controle negativo. Ambos os grupos obtiveram taxas de fertilidade e eclosão superior a 80%. Assim o EBHL pode ser utilizado com indutor de desova em dose fracionada como empregado para outras espécies (CRISCUOLO-URBINATI et al., 2012; HAINFELLNER et al., 2012; VIVEIROS et al., 2013; KURADOMI; FORESTI; BATLOUNI, 2017; KURADOMI; BATLOUNI; 2018; PEREIRA et al., 2018; SOUZA et al., 2018).

Neste estudo o uso de EBHL promoveu a desova em *P. lineatus* e pode ser usado como substituto do extrato de hipófise de carpa, importada e de custo elevadíssimo (R\$1500,00/grama). Este trabalho traz uma importante vantagem para a produção de peixes migradores no Brasil e no mundo, visto que a utilização do extrato bruto de hipófise ainda é a melhor alternativa para muitas espécies comercialmente utilizadas (CAROSLFELD et al., 1988; RAMOS et al., 1997; ACUNÃ; RANGEL; 2009; PAULINO et al., 2011; DE SOUZA et al., 2015; ITTZÉS et al., 2015; PEREIRA et al., 2017; 2018). Além disso, a o uso do EBHL torna-se uma forma valiosa de agregar valor à produção desta espécie. Além disso, considerando a aceleração de sua crescente produção nos últimos anos de mais de 130% (IBGE, 2017) indica que hipófises desta espécie estão disponíveis em quantidades suficientes dando grande valor as cabeças que muitas vezes são descartadas. Assim a utilização do EBHL minimizaria os custos de importação de EBHC além contribuir para viabilidade econômica e sustentabilidade (MOULIN, 2011) na produção de espécies de pequeno e médio porte, e futuramente, dependendo do escalonamento, da produção também em espécies de grande porte como o pacu.

Por fim, o lambari por apresentar desova em boa parte do ano dos ovários (CASSEL et al., 2017) e se preparar novamente para a desova em cinco dias (LIRA et al., 2018) pode potencialmente permitir a produção de extrato por período mais longo que as carpas que desovam normalmente uma vez por ano. Esta possibilidade hipotética se sustenta também no fato de que

resultados similares entre os doadores nos meses de outubro e dezembro foram encontrados neste estudo.

7. Considerações finais

Neste estudo concluímos que o EBHL induz a desova em *P. lineatus*, entretanto pode intensificar a desova de *A. altiparanae*. As condições empregadas neste estudo permitem obter o EBHL 100 % de fêmeas maduras após um ou três meses do povoamento em meses de primavera ou verão, garantindo a obtenção de extrato com ação indutora de desova. Assim, *A. altiparanae* não é bom modelo biológico na reprodução induzida, pois as fêmeas desovam sem necessidade de indução e mesmo nos melhores tratamentos, uma fração muito baixa das fêmeas, efetivamente desovam. Mesmo assim, nosso estudo permite concluir que a dose fracionada de EBHC ou EBHL é mais indicada para esta espécie do que a dose única. Os níveis plasmáticos de 17,20 β -P nos momentos aqui amostrados não explicam as pouco frequentes diferenças encontradas entre tratamentos e controle, quando fracionamos a dose de indução no lambari. Mesmo assim, o EBHL, mas não o EBHC, provocou elevações em relação aos níveis basais de 17,20 β -P, reforçando seu potencial uso para fins comerciais.

8. Referências

ACUÑA, J. J. A.; RANGEL, J. L. H. Effects of hypophysial extract of common carp and the analog of the GnRH on the final maturation oocyte and the spawning of cachama negra (*Colossoma macropomum*). **Revista Científica**, FCV-LUZ, v. 19, p. 486-494, 2009.

AGOSTINHO, C.A.; MOLINARI, S. L.; AGOSTINHO, A. A.; VERANI, J.R. Ciclo reprodutivo e primeira maturação sexual de fêmeas do lambari, *Astyanax bimaculatus* (L.) (Osteichthyes- Characidae) do Rio Ivaí, Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 44, p. 31-36, 1984.

ALCÂNTARA ROCHA, R. C. G.; CECCARELLI, P. S.; GASPAR, L. A.; BERNARDINO, G. O Banco de hipófises de curimatá, *Prochilodus lineatus*

Valenciennes, 1847, no CEPTA – Método de extração e preservação. **Boletim técnico do CEPTA**, v.1, p.1-12, 1989.

AMARAL JR, H. R. Utilização de extrato hipofisário de galinha *Gallus domesticus*, para indução a desova de tenca *Tinca tinca* (L.1758). Opção de banco de hipófise para o pequeno produtor rural. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 5, p. 134-138, 1998.

ANDRADE, D.R.; YASUI, G.S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 166–172, 2003.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA PISCICULTURA. PEIXE BR. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-peixe-br-da-piscicultura-2019//>. Acesso em: 10 maio 2019.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 3. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2013.

BRAMBILA-SOUZA, G.; MYLONAS, C.C.; MELLO, P.H.; KURADOMI, R.Y.; BATLOUNI, S. R.; TOLUSSI, C.E.; MOREIRA, R.G. Thermal manipulation and GnRHa therapy applied to the reproduction of lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae* females (Characiformes: Characidae) during the non-breeding season. **General and comparative endocrinology**, v. 279, p. 120-128, 2019.

CARNEIRO, P. C.; MIKOS, J. D. Gonadotrofina coriônica humana e hormônio liberador de gonadotrofina como indutores da reprodução do jundiá. **Acta Scientiarum Animal Science**, v.30, p.345-350, 2008.

CAROLSFELD, J., RAMOS, S. M., ORMANEZI, R., GOMES, J. H., BARBOSA, J. M., HARVEY. Analysis of Protocols for Application of LHRH Analog for Induced Final Maturation and Ovulation of Female Pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887). **Aquaculture**, v. 74, p. 49–55, 1988.

CASSEL, M.; CAMARGO, M, P.; JESUS, L.W.O.; BORELLA, M.I. Involution processes of follicular atresia and post-ovulatory complex in a characid fish ovary: a study of apoptosis and autophagy pathways. **Journal of Molecular Histology**, v.48, p. 243-257, 2017.

CETTA, F.; GOETZ, F. W. Ovarian and plasma prostaglandin E and F levels in brook trout (*Salvelinus fontinalis*), during Pituitary-Induced Ovulation. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 1216-1221, 1982.

CHAUBE, R.; SINGH, R. K.; JOY, K. P. Effects of ovaprim, a commercial spawning inducer, on vasotocin and steroid hormone profiles in the catfish *Heteropneustes fossilis*: In vivo and in vitro studies. **General and Comparative Endocrinology**, v.195, p.190-200, 2014.

CHEHADE, C., CASSEL, M., BORELLA, M.I. Induced reproduction in a migratory teleost species by water level drawdown. **Neotropical Ichthyology**, v.13, p. 205–212, 2015.

CLELLAND, E.; PENG, C. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.312, p. 42–52, 2009.

COLPO, C. V.; CUNHA, M. A.; MEDEIROS, T.S.; BALDISSEROTTO, B. Rendimento e viabilidade da extração de hipófise de jundiá (*Rhamdia quelen*). *Ciência Rural*, v. 41, p. 901-903, 2011.

CRESPO, D.; PRAMANICK, K.; GOETZ, F.W.; PLANAS, J.V. Luteinizing hormone stimulation of in vitro ovulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) involves follicle contraction and activation of proteolytic genes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 188, p. 175-182, 2013.

CRISCUOLO-URBINATI E.; KURADOMI R.Y.; URBINATI, E.C.; BATLOUNI, S.R. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Theriogenology**, v. 78, p. 2087-2094, 2012.

DE ALMEIDA, M. D.; PEREIRA, T. S. B.; BATLOUNI, S. R.; BOSCOLO, C. N. P.; DE ALMEIDA, E. A. Estrogenic and anti-androgenic effects of the herbicide tebuthiuron in male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquatic Toxicology**, v. 194, p. 86- 93, 2018.

DE SOUZA, T. G.; HAINFELLNER, P.; KURADOMI, R.Y.; MUÑOZ, M. E.; HONJI, R.M.; MOREIRA, R.G.; BATLOUNI, S. R. Inappropriate management conditions, especially for the regressed class, are related to sperm quality in *Prochilodus lineatus*, **Theriogenology**, v. 83, p. 797-807, 2015.

DONALDSON, E. M. Manipulation of reproduction in farmed fish. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 381–392, 1996.

DONALDSON, E.M.; HUNTER, G. **Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fish**. En: Hoar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E.M. (Ed), Fish Physiol. Academic Press, N. Y. p. 351-403, 1983.

DOS SANTOS, M. P.; YASUI, G. S.; XAVIER, P. L. P.; DE MACEDO ADAMOV, N. S.; DO NASCIMENTO, N. F.; FUJIMOTO, T. ; SENHORINI, J. A. ; NAKAGHI, L. S. O. Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote**, v. 1, p. 1-13, 2016.

EVANGELISTA, M. M., SUSSEL, F. R.; ROMAGOSA, E. Environmental manipulation on *Astyanax altiparanae* out-of-season spawning. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 47, p. 292-302, 2019.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. In: The state of world fisheries and aquaculture, 2018. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>>. Acesso em 15 maio 2018.

FELIZARDO, V. O.; MURGAS, L. D. S.; ANDRADE, E. S.; LÓPEZ, P. A.; FREITAS, R. T. F.; FERREIRA, M. R. Effect of timing of hormonal induction on

reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). **Theriogenology**, v.77, p.1570-1574, 2012.

FERREIRA, P.M.F.; NASCIMENTO, L.S.; DIAS, D.C.; MOREIRA, D.M.V.; SALARO, A.L.; FREITAS, M.B.D. Essential Oregano Oil as a Growth Promoter for the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 45, n. 1, 2014.

FIGUEIREDO-ARIKI, D. G. **Protocolos de indução hormonal com extrato bruto de hipófises de carpa e o perfil da prostaglandina F2 α durante a maturação final e ovulação em *Astyanax altiparanae***. 2019. 53f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, 2019.

GARUTTI, V., BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da Bacia do Alto Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS**, v.13, p.65-88, 2000.

GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. São Paulo: Editora UNESP, 336p., 2003.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae), com mancha umeral horizontalmente ovalada, da Bacia do Rio Guaporé, Amazônia. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 40, p. 217-229, 1997.

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

GOETZ, F.W.; CETTA, F. Ovarian and plasma PGE and PGF in naturally ovulating brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the effects of indomethacin on prostaglandin levels. **Prostaglandins**, v.26, p. 387-395, 1983.

GONÇALVES, L.U., PARISI, G., BONELLI, A., SUSSEL, F.R.; VIEGAS, E.M.M. The fatty acid compositions of total, neutral and polar lipids in wild and farmed lambari (*Astyanax altiparanae*) (Garutti & Britski, 2000) broodstock. **Aquaculture Research**, v.45, p. 195-203, 2014.

HAINFELLNER, P.; KURADOMI, R.Y.; SATO, R.; FIGUEIREDO, D; FREITAS, G.A.; QUEIROZ, L. D.; VALENTI, W. C.; VALENTI, P.; GE, W; BATLOUNI, S. R. Reproductive cycle of the Amazonian planktivorous catfish *Hypophthalmus marginatus* (Siluriformes, Pimelodidae). **Aquaculture Research**, p. 1-10, 2019.

HAINFELLNER, P.; SOUZA, T. G.; MOREIRA, R. G., NAKAGHI, L. S. O.; BATLOUNI, S. R. Gonadal steroids levels and vitellogenesis in the formation of oocytes in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Teleostei:Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v.10, p.601-612, 2012.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal 2017. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf >. Acesso em 15 out. 2018.

ITTZÉS, I.; SZABÓ, T.; KRONBAUER, E. K.; URBANYI, B. Ovulation induction in jundia (*Rhamdia quelen*, Heptapteridae) using carp pituitary extract or salmon GnRH analogue combined with dopamine receptor antagonists. **Aquaculture Research**, v. 46, p. 2924–377, 2015.

JALABERT, B.; SZÖLLÖSI, D. In vitro ovulation of trout oocytes: effect of prostaglandin on smooth muscle-like cells of the theca. **Prostaglandins**, v. 9, p.765–779, 1975.

JESUS, L.W.O.; BOGERD, J.; VIECELI, F.M.; BRANCO, G.S.; CAMARGO, M.P.; CASSEL, M.; MOREIRA, R.G.; YAN, C.Y.I.; BORELLA, M.I. Gonadotropin subunits of the characiform *Astyanax altiparanae*: Molecular characterization, spatiotemporal expression and their possible role on female

reproductive dysfunction in captivity. **General and Comparative Endocrinology**, v. 15, p. 150-163, 2017.

KURADOMI, R. Y.; FORESTI, F.; BATLOUNI, S. R. The effects of sGn-RHa implants on *Piaractus mesopotamicus* female breeders: An approach addressed to aquaculture. *Aquaculture International*, v.25, p. 2259–2273, 2017.

KURADOMI, R. Y.; BATLOUNI, S. R. PGF2 α and gonadal steroid plasma levels of successful and unsuccessful spawning *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, Characiformes) females. **Aquaculture international**, v. 26, p. 1083-1094, 2018.

LEVAVI-SIVAN, B.; BOGERD, J.; MAÑANÓS, E. L.; GÓMEZ, A.; LAREYRE, J. J. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, v.165, p. 412-437, 2010.

LEVAVI-ZERMONSKY, B.; YARON, Z. Changes in gonadotropin and ovarian steroids associated with oocytes maturation during spawning induction in the carp. **General and Comparative Endocrinology**, v. 62, p.89-98, 1986.

LIRA, L. V. G.; KURADOMI, R.Y.; SOUZA, T. G.; HAINFELLNER, P.; BATLOUNI, S.R. *Astyanax altiparanae* ovarian maturation after spawning in water recycling systems. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, p. 1-10, 2018.

LOPES, J. P.; SOUZA, J. G.; ROCHA, M. C. F. Nova metodologia de hipofisectomia em curimatã *Prochilodus brevis* (Pisces, Prochilodontidae). **Revista Brasileira Engenharia de Pesca**, v.1, p. 91-101, 2006.

MARTINS, C.R.; POUEY, J.L.F.O.; VAZ, B.S.; LOPES, P. R. S. Extração e rendimento da hipófise da *Cyphocharax voga* em relação à maturação gonadal e ao sexo. **Archivos de Zootecnia**, v.57, p.284-286, 2008.

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

MOULIN, A. R. Reprodução induzida de lambari (*Astyanax* sp.) com extrato hipofisário de tilápia, de frango e de rã. In: XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 2011, São José dos Campos, SP. Disponível em http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2011/anais/arquivos/RE_0521_1213_01.pdf. Acesso em 08 out. 2016.

MPA – **Ministério da pesca e Aquicultura**. 1º Anuário brasileiro da pesca e aquicultura. 132p, 2014.

MURGAS, L. D. S., FELIZARDO, V. O.; FERREIRA, M. R., VERAS, G. V., ANDRADE, E. S., PAULA, D. A. J. Eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. **Ciência Animal**, v. 22, p. 197-206, 2012.

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

MYLONAS, C.; ZOHAR, Y. Use of GnRHa-delivery system for the control of reproduction in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, p. 463-491, 2001.

NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA, M. Regulation of oocyte maturation in fish. **Development Growth and Differentiation**. v. 50, p. 195–219, 2008.

NAKAYAMA, C. L. **Reprodução induzida e criopreservação do sêmen de papa-terra *Menticirrhus americanus* (Perciformes: Sciaenidae)**. 2011. 89 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, 2011.

NASCIMENTO, N. F.; PEREIRA-SANTOS, M.; PIVA, L. H.; MANZINI, B.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; YASUI, G. S.; NAKAGHI, L. S. O. Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Aquaculture**, v. 471, p. 163-171, 2017.

NAVARRO, R.D.; SILVA, R.F.; FILHO, O.P.R.; CALADO, L.L.; REZENDE, F.P.; SILVA, C.S.; SANTOS, L.C. Comparação morfométrica e índices somáticos de machos e fêmeas do lambari prata (*Astyanax scabripinnis* Jerenyns, 1842) em diferente sistema de cultivo. **Zootecnia Tropical**, v. 24, p.165-176, 2006.

NUNES, L. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; REIS, F. Y. T.; NERES, R. W. P. N.; SILVA, S. Q. Reprodução de peixes reofílicos nativos do Brasil: fertilização artificial e qualidade da água. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.42, p.15-21, 2018.

NWADUKWE, F. O. Inducing oocyte maturation, ovulation and spawning in the African catfish, *Heterobranchus longifilis* Valenciennes (Pisces: Clariidae), using frog pituitary extract. **Aquaculture and Fisheries Management**, Oxford, v.24, n.6, p. 625-630, 1993.

OGIWARA, K.; FUJIMORI, C.; RAJAPAKSE, S.; TAKAHASHI, T. Characterization of Luteinizing Hormone and Luteinizing Hormone Receptor and Their Indispensable Role in the Ovulatory Process of the Medaka. **Plos one**, v.8, 2013.

OGIWARA, K.; TAKAHASHI, T. A Dual Role for Melatonin in Medaka Ovulation: Ensuring Prostaglandin Synthesis and Actin Cytoskeleton Rearrangement in Follicular Cells. **Biology of Reproduction**, v. 94, p.1-15, 2017.

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

PEREIRA, G. J. M.; MURGAS, L. D. S.; SILVA, J. M. A.; MILIORINI, A. B.; LOGATO, P. V. R.; LIMA, D. Indução da desova de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizando eCG E EBHC. **Revista Ceres**, v. 2, p. 156-160, 2009.

PEREIRA, T. S. B.; BOSCOLO, C. N. P.; MOREIRA, R. G.; BATLOUNI, S. R. 2016. The use of mGnRHa provokes ovulation but not viable embryos in *Leporinus macrocephalus*. **Aquaculture International**, v.25, p. 515–529, 2017.

PEREIRA, T. S. B.; BOSCOLO, C.N.P.; MOREIRA, R. G.; BATLOUNI, S. R. *Leporinus elongatus* induced spawning using carp pituitary extract or mammalian GnRH analogue combined with dopamine receptor antagonists. **Animal reproduction**, v.15, p.64-70, 2018.

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

PODHOREC, P.; SOCHA, M.; AMMAR, I. B.; SOKOLOWSKA-MIKOLAJCZYK, M.; BRZUSKA, E.; MILLA, S.; GOSIEWSKI, G.; STEJSKAL, V.; SIMKO, M.; KOURIL. The effects of GnRHa with and without dopamine antagonist on reproductive hormone levels and ovum viability in tench *Tinca tinca*. **Aquaculture**, v. 465, p. 158-163, 2016.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTTO, B. E GOMES, L.C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Brasil: editora UFSM, p. 101 –115, 2018.

RAHMAN, M. A.; OHTA, K.; CHUDA, H.; NAKANO, S.; MARUYAMA, K.; MATSUYAMA, M. 2001. Gonadotropin-induced steroidogenic shift towards maturation-inducing hormone in Japanese yellowtail during final oocyte maturation. **Journal of Fish Biology**, v.58, p.462-474, 2001.

RAMOS, R. O.; RAMOS, S. M.; MENDONÇA, J. O. J. Utilização de análogos do LHRH na indução à ovulação do Matrinchã, *Brycon cephalus*. (GÜNTHER, 1869). **Boletim Técnico CEPTA**, v. 10, p. 1-7, 1997.

SALARO, A.L.; CAMPELO, D. A. V.; PONTES, M.D.; ZUANON, J. A. S.; FURUYA, V.R.B.; FURYA, W. M. Avanços na nutrição e produção de lambaris. In: Marcos Tavares-Dias; Wagner dos Santos Mariano. (Org.). Aquicultura no Brasil: Novas Perspectivas: Produção e Reprodução de Organismos Aquáticos. 1ed.São Carlos: Pedro & João Editores, v. 2, p. 491-502, 2015.

SATO, Y.; SAMPAIO, E. V.; FENERICH-VERANI, N; VERANI, J. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, p.267- 273, 2006.

SENTHILKUMARAN, B.; YOSHIKUNI, M.; NAGAHAMA, Y. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 215, p. 11-18, 2004.

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; SILVA, A. P. S.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Morphology of the urogenital papilla and its component ducts in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 13, p. 309-316, 2015.

SOLIS-MURGAS, L. D.; V.O. FELIZARDO, V.O.; M.R. FERREIRA, M.R.; ANDRADE, E.S.; VERAS, G.C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 186–191, 2011.

SOUZA, E.D.; STREIT JR, D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; ARDOZO, R.M.; JUNIOR, E.L.; SAKAGUTI, E.S.; MENDEZ, L.D.V. Extratos de hipófise de frango e coelho na indução reprodutiva da carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 25, p. 99-107, 2003.

SOUZA, F. N.; MARTINSA, E. F.F.; FILHO, R.A.C.C.; ABREU, J.S.; PIRES, L.B.; STREIT JR, D.P., LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J. A. Ovopel® and carp pituitary extract for induction of reproduction in *Colossoma macropomum* females. **Animal Reproduction Science**, v. 195, p.53–57, 2018.

SOUZA, T. G. **Desempenho reprodutivo e diferenciação gonadal em piautês-pintas**, *Leporinus friderici*, **Bloch 1794**. 2015. 80f. Tese (doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” - Caunesp, Jaboticabal, 2015.

STACEY, N E.; PANDEY, S. Effects of indomethacin and prostaglandins on ovulation of goldfish. **Prostaglandins** v.9, p.597-607, 1975

STREIT JR., D. P.; MORAES, J. V.; RIBEIRO, R. P.; CARDOZO, R. M.; MOREIRA, H. L. M. As tendências da utilização do extrato de hipófise na reprodução de peixes – Revisão. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.5, p.231-238, 2003.

STREIT JR., D. P.; MORAES, J. V.; RIBEIRO, R. P.; SAKAGUTI, E. S.; SOUZA, E. D.; POVH, J. A.; CAÇADOR, W. Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.147-153, 2004.

SUSSEL, F. Lambaricultura. **Casa da Agricultura**, São Paulo, n.3, p. 1-48, 2017.

SUSSEL, F. R. Lambari: Pequeno no tamanho, grande no potencial. **Panorama da Aquicultura**. v.25, p. 50-53, 2015.

TAKAHASHI, A., KANDA, S., ABE, T., OKA, Y. Evolution of the hypothalamic pituitary-gonadal axis regulation in vertebrates revealed by knockout medaka. **Endocrinology**, v.157, p. 3994-4002, 2016.

TAKAHASHI, T., HAGIWARA, A.; OGIWARA, K. Prostaglandins in teleost ovulation: A review of the roles with a view to comparison with prostaglandins in mammalian ovulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 461, p. 236–247, 2018.

TANG, H.; LIU, Y.; LI, J.; LI, G.; CHEN, Y.; YIN, Y.; GUO, Y.; CHENG, C. H. K.; LIU, X.; LIN, H. LH signaling induced ptgs2a expression is required for ovulation in zebrafish. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 447, p. 125–133, 2017.

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

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

VENTURIERI, R; BERNARDINO, G. Hormônios na Reprodução Artificial de Peixes. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 55, p. 1–18, 1999.

VIVEIROS, A. T. M.; GONÇALVES, A. C. S.; DI CHIACCHIO, I. M.; NASCIMENTO, A. F.; ROMAGOSA, E.; LEAL, M. C. 2013. Gamete quality of streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) after GnRHa and dopamine antagonist treatment. **Zygote**. v.23, p.1-10, 2013.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: Escopo, 1983. 220p.

YARON, Z., BOGOMOLNAYA, A., DRORI, S., AIZEN, J., KULIKOVSKY, LEVAVI-SIMAN, B. Spawning Induction in the Carp: Past Experience and Future Prospects - A Review. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v.1, p.5-26, 2009.

YARON, Z.; LEVAVI-SIVAN, B. **Endocrine Regulation of Fish Reproduction**. In Farrell, AP, 684 ed, Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment. Academic Press: 685 San Diego 2011; Vol 2., p.1500–1508, 2011.

YU, J.Y.L.; SHEN, S. T.; LIU, C.T.; WENG, C. F.; PENG, H. K.; LIU, F.G. Comparative effects of avian and piscine gonadotrophins on gonadal steroidogenesis, and of avian and piscine pituitaries on induction of spermiation and ovulation in the loach and White silver carp. **Aquaculture**, v.135, p.59-72, 1995.

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

ZOHAR, Y.; MYLONAS, C.C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. **Aquaculture**, p. 99–136, 2001.

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

ZOHAR, Y.; MUÑOZ-CUETO, J.; ELIZUR, A.; KAH, O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, v.165, p. 438-455, 2010.