



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Centro de Aquicultura da Unesp- CAUNESP



**EFEITO DE DIFERENTES INDUTORES HORMONAIIS SOBRE O
PROCESSO DE MATURAÇÃO FINAL E OVULAÇÃO EM
*Leporinus macrocephalus***

THIAGO SCREMIN BOSCOLO PEREIRA

JABOTICABAL

JULHO – 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Centro de Aquicultura da Unesp- CAUNESP



**EFEITO DE DIFERENTES INDUTORES HORMONAIS SOBRE O PROCESSO
DE MATURAÇÃO FINAL E OVULAÇÃO EM *Leporinus macrocephalus***

Doutorando: Thiago Scremin Boscolo Pereira

Orientador: 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 em Aquicultura

JABOTICABAL

JULHO – 2013

Pereira, Thiago Scremin Boscolo
P436e Efeito de diferentes indutores hormonais sobre o processo de
maturação final e ovulação em *Leporinus macrocephalus* / Thiago
Scremin Boscolo Pereira. -- Jaboticabal, 2013
xix, 45 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2013

Orientador: Sergio Ricardo Batlouni

Banca examinadora: Carlos Alberto Vicentini, Laura Satiko
Okada, Luis David Solis Murgas, Maria Inês Borella

Bibliografia

1. Peixes reofílicos. 2. Reprodução induzida. 3. Desenvolvimento
ovocitário. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.034

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

REITORIA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFEITO DE DIFERENTES INDUTORES HORMONAIS NO PROCESSO DE MATURAÇÃO FINAL E OVULAÇÃO EM LEPORINUS MACROCEPHALUS

AUTOR: THIAGO SCREMIN PEREIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Aquicultura , pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI

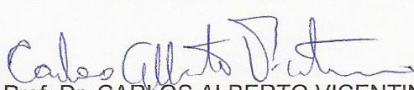
Laboratório de Reprodução de Peixes / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"


Prof. Dr. LUÍS DAVID SOLIS MURGAS


Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Federal de Lavras


Prof. Dra. MARIA INÊS BORELLA

Departamento de Histologia e Embriologia / Universidade de São Paulo


Prof. Dr. CARLOS ALBERTO VICENTINI

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru


Prof. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 12 de julho de 2013.

DEDICATÓRIA

A minha amada e companheira, Camila, por todo o amor, apoio, paciência, dedicação e companheirismo. Ao meu querido filho Pedro Henrique, meu maior tesouro, quem me dá tantas alegrias e quem me faz sorrir nos momentos em que estou triste. Muito obrigado por vocês estarem do meu lado sempre me incentivando e me dando muita força para eu conseguir alcançar meus sonhos... Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Sergio Ricardo Batlouni, pela orientação, dedicação, confiança e ensinamentos que possibilitaram meu crescimento profissional e intelectual;

Aos meus pais que sempre acreditaram no meu sonho e nos meus ideais;

As professoras Dr^a Renata Guimarães Moreira e a Prof^a Dr^a Elizabeth Romagosa pela participação e sugestões feitas na minha qualificação;

Aos professores Dr. Carlos Alberto Vicentini, Dr. Luis David Solis Murrigas, Dr^a Laura Satiko Okada e Dr^a Maria Inês Borella pela participação e sugestões feitas na defesa;

A todos os amigos do laboratório de Reprodução de Peixes pelo ajuda durante a coleta de dados. O apoio de todos vocês foram fundamental para o desenvolvimento e a conclusão do trabalho;

Ao Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Peixes da Universidade de São Paulo, pela colaboração nas análises dos esteroides;

Ao Laboratório de Morfologia da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, pela colaboração nas análises histológicas;

A Fiona e a Serena, por me alegrarem sempre e por me ensinarem que não precisamos de muito para ser feliz;

Ao grande amigo Julian David Alvarado Castillo pela amizade e companheirismo;

Aos colegas, funcionários e professores do Caunesp, pela boa convivência e pelos ensinamentos transmitidos durante estes anos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo durante os primeiros meses do doutorado;

A Fundação de Amparo e Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo durante 36 meses de doutorado (Processo nº 2010/08334-7);

A todos aqueles que ajudaram na condução deste trabalho.

Um muito obrigado, com eterna gratidão!

SUMÁRIO

Revisão de Literatura – 1

Referências bibliográficas – 4

Resumo – 7

Abstract – 9

1. Introdução – 11

2. Material e Métodos – 13

2.1. Manutenção dos Peixes – 13

2.2. Indução a desova – 13

2.3. Desempenho reprodutivo – 14

2.3.1. Período de latência e percentual de desova – 14

2.3.2. Taxa de fertilização e eclosão – 15

2.3.3. Fecundidade absoluta e índice gonadossomático – 15

2.4. Avaliação do estágio de maturação gonadal por meio de canulação – 15

2.5. Hidratação dos ovos – 16

2.6. Análise morfológica dos ovários – 16

2.7. Migração da vesícula germinativa – 17

2.8. Coleta de sangue e dosagem hormonal – 17

2.9. Volume de densidade dos ovócitos – 18

3.0. Análise de dados – 19

3.1. Nota ética – 19

4. Resultados – 19

4.1. Desempenho reprodutivo – 19

4.2. Avaliação dos tipos de ovócitos coletados através de canulação ovariana – 20

4.3. Hidratação dos ovos – 20

4.4. Morfologia dos ovários – 20

4.5. Migração da vesícula germinativa – 20

4.6. Esteroides gonadais – 21

4.7. Volume de densidade – 22

4.7.1. Antes da segunda dose – 22

4.7.2. Após a ovulação – 22

5. Discussão – 23

6. Referências bibliográficas – 29

Tabelas – 36 a 40

Figuras – 41 a 45

REVISÃO DE LITERATURA

As espécies de peixes migradoras ou reofílicas são aquelas que durante um determinado período realizam migrações ao longo dos rios para se reproduzir (Godinho et al., 2007; Zaniboni-Filho & Weingarner, 2007). Quando essas espécies são mantidas sob condições de criação, ocorrem problemas no processo reprodutivo, provavelmente pela ausência de condições ambientais propícias, sobretudo temperatura, pluviosidade e fotoperíodo (Mylonas et al., 2010), além do estresse provocado pelo confinamento (Milla et al., 2009; Schreck, 2010). Neste contexto, apesar de muitas destas espécies apresentarem suas gônadas desenvolvidas até estágios avançados de maturação, as etapas finais do processo reprodutivo, tais como maturação final dos ovócitos e ovulação só são atingidas mediante tratamentos hormonais (Batlouni et al., 2006; Mylonas et al., 2010). A razão destas espécies não atingirem as etapas finais do processo reprodutivo em cativeiro ainda é desconhecida, embora, provavelmente esteja ligada ao controle neuro-endócrino da reprodução. Desta forma, as espécies reofílicas precisam ser induzidas hormonalmente em cativeiro para que se possa proceder aos processos de maturação final e desova nas fêmeas e propiciar o aumento do volume de sêmen nos machos (Mylonas et al., 2010).

Dentre as espécies nativas reofílicas, o *Leporinus macrocephalus*, destaca por ser uma espécie bastante estudada com relação à sua reprodução em cativeiro (Rezende et al., 1996; Zaniboni Filho & Barbosa, 1996; Sato et al., 2003; Sampaio & Sato, 2009). As espécies do gênero *Leporinus* são onívoras, predominantemente herbívoras, alimentando-se de algas, macrófitas aquáticas, frutos, larvas de insetos e zooplâncton. Em cativeiro, adaptam-se muito bem às rações artificiais, tornando-se atrativos para a piscicultura intensiva (Castagnolli, 1992). Popularmente, esses peixes são conhecidos como piaçu e são espécies que realizam migrações reprodutivas, reproduzindo na

cabeceira dos rios de novembro a janeiro (Britsky, 1999). O piaçu é uma espécie que apresenta desova total, ou seja, os ovócitos maturam e são liberados em um único lote, no entanto, em cativeiro a maturação final dos ovócitos, a ovulação e a desova, só são atingidas mediante tratamentos hormonais (Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007).

No Brasil, seguramente a metodologia para a indução hormonal de peixes reofílicos mantidos em cativeiro mais aplicada é a hipofiseção (Nagahama & Yamashita, 2008; Mylonas et al., 2010). Este método foi desenvolvido na década de trinta, tendo como um dos seus principais precursores Rodolpho von Ihering (Von Ihering & Azevedo, 1936). Esta técnica, originalmente desenvolvida a partir da aplicação de extrato de pituitária de peixes maduros, retoma a meiose e promove a maturação final dos ovócitos (von Ihering & Azevedo, 1936; Nagahama & Yamashita, 2008, Mylonas et al., 2010). No entanto, hoje em dia, pode se dizer que esta técnica, continua trazendo resultados inesperados e às vezes desfavoráveis no processo de indução hormonal (Hainfellner et al., 2012a; Criscuolo-Urbinati et al., 2012). É muito comum se deparar com relatos de produtores e de pesquisadores sobre resultados inadequados e ou insuficientes obtidos com a reprodução induzida por extrato de hipófise. Os problemas relatados podem estar em distintas etapas do processo de indução hormonal. Muitas vezes, fêmeas consideradas “aptas” (maduras) à indução hormonal não respondem satisfatoriamente aos tratamentos, e é justamente no processo de indução hormonal das fêmeas, que se encontra a maior parte dos resultados adversos (Hainfellner et al., 2012a; Criscuolo-Urbinati et al., 2012).

A utilização de hipófise para a indução a desova de peixes reofílicos, embora seja bastante difundida e utilizada, apresenta algumas desvantagens, dentre elas: a hipófise possui além dos hormônios gonadotróficos (FSH e LH) necessários a indução hormonal, hormônios de crescimento e osmorreguladores, entre outros, o que causa

elevado estresse nos indivíduos receptores, reduzindo a vida útil dos reprodutores (Mylonas et al., 2010). Existe também a possibilidade das hipófises transmitirem doenças aos animais receptores (Donaldson & Hunter, 1983). Além disso, a comercialização e a utilização do extrato bruto de hipófise encontram-se proibido em algumas regiões do Brasil, devido a questões sanitárias. Diante destes problemas a procura de novas alternativas para obtenção de desovas em teleósteos conduziu à busca por produtos sintéticos como o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Garber et al., 2009; Pham et al., 2010; Vazirzadeh et al., 2011) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Mousa, 2010; Cejko et al., 2012).

O GnRH é um decapeptídeo (Mylonas et al., 2010) bastante conhecido, o qual apresenta a função de estimular a síntese e a liberação de gonadotrofinas pela hipófise, exercendo, dessa forma, grande importância na regulação do processo de gametogênese (Zohar et al., 2010). A administração do GnRH na indução a desova de peixes reofílicos apresenta diversas vantagens com relação ao uso do extrato bruto de hipófise: o GnRH é aparentemente incapaz de desencadear resposta imune; atua em altos níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas proporcionando uma estimulação mais balanceada dos eventos reprodutivos e possivelmente melhor integração com outras funções fisiológicas; são sintetizados quimicamente e não transmitem doenças aos reprodutores, perigo este, sempre associado ao uso dos extratos de hipófise (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010).

A indução a reprodução de espécies reofílicas nativas através da administração do hCG tem sido amplamente utilizado (Leonardo et al., 2004; Nakayama et al., 2012). Este hormônio possui a função de atuar diretamente nas gônadas induzindo a maturação final, ovulação e espermição dos teleósteos que são mantidos em cativeiro (Mousa, 2010; Cejko et al., 2012). Assim como o GnRH, o hCG apresenta a vantagem da

certeza da igualdade das dosagens (quantidade conhecida e exata de hormônio), além disso, é um hormônio de fácil aquisição e pode ser estocado por longos períodos (Andrade & Yasui, 2003). No entanto, existem diversas variações de protocolos (dosagens) e respostas dos teleósteos mediante sua administração (Leonardo et al., 2004; Mousa, 2010; Cejko et al., 2012).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, D. R., Yasui, G. S., 2003. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 27, 166-172.

Batlouni, S. R., E. Romagosa., M. I. Borella. 2006. The reproductive cycle of male catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction Science*, 96, 116-132.

Britski, H. A., Silimon, K. Z. S., Lopes, B. S. Peixes do Pantanal. Manual de Identificação. Embrapa, 184p, 1999.

Castagnolli, N. Criação de peixes de água doce. Jaboticabal: FUNEP. 189 p, 1992.

Cejko, B. I., Targonska, K., Kowalski, R. K., Żarski, D., Sarosiek, B., Kucharczyk, D., Glogowski, j., 2012. The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). *Journal Applied Ichthyology*, 28, 873–877.

Cejko, B. I., Targonska, K., Kowalski, R. K., Żarski, D., Sarosiek, B., Kucharczyk, D., Glogowski, j., 2012. The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). *Journal Applied Ichthyology*, 28, 873–877.

Criscuolo – Urbinati, E., Kuradomi, R. Y., Urbinati, E. C., Batlouni, S. R. 2012. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Theriogenology*, 78, 2087 – 2094.

Donaldson, E. M & HUNTER G. M. Induced final maturation, ovulation, and spermiation. *Fish physiology*. New York: Academic Press, v.9, p.351-403, 1983.

Garber, A. F., Fordham, S. E., Symonds, J. E., Trippel, E. A., Berlinsky, D. L., 2009. Hormonal induction of ovulation and spermiation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 296, 179–183.

Godinho, A. L., Kynard, B., Godinho H.P., 2007. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. *Environmental Biology Fish*, 80, 421-433.

Hainfellner, P., M. E. Munõz, T. G. De Souza, G. A. Freitas, S. R. Batlouni. 2012a. Spawning failure in *Brycon amazonicus* may be associated with ovulation and not with final oocyte maturation. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64, 515 – 517.

Leonardo, A. F. G., E. Romagosa, M. I. Borella, S. R. Batlouni. 2004. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus,1766). *Aquaculture*, 240, 451-461.

Milla, S., Wang, N., Mandiki, S. N. M., Kestemont, P., 2009. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology*, 153, 242–251.

Mousa, M. A., 2010. Induced spawning and embryonic development of *Liza ramada* reared in freshwater ponds. *Animal Reproduction Science*, 119, 115–122.

Mylonas, C. C., A. Fostier, S. Zanuy. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 516-534.

Nagahama, Y. & M. Yamashita. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth & Differentiation*, 50, 195-21.

Nakayama, C. L., Sampaio, L. A., Robaldo, R. B., 2012. Reprodução induzida do papa-terra *Menticirrhus americanus* (Pisces: Sciaenidae) utilizando hCG. *Atlantica*, Rio Grande, 34, 53-56.

Pham, H. Q., Nguyen, A. T., Nguyen, M. D., Arukwe, A., 2010. Sex steroid levels, oocyte maturation and spawning performance in Waigieu seaperch (*Psammoperca waigiensis*) exposed to thyroxin, human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone releasing hormone and carp pituitary extract. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 155, 223–230.

Rezende, A. P. S., Alves, C. B. M., Silva, M. O. B., Mello, C. B. M., 1996. Avaliação da maturação gonadal e indução da reprodução de peixes coletados no Rio Grande, a jusante da UHE, Itutinga, MG. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootécnica*, 48, 39-46.

Sampaio, E. V., Sato, Y., 2009. Aspectos reprodutivos de *Leporinus piau* Fowler, 1941 (Osteichthyes), anostomidae) da bacia do rio São Francisco, submetido a desova induzida. *Ciência Animal brasileira*, 10, 157-165.

Sato, Y., Fenerich-Verani, N., Godinho, H. P., 2003. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, p. 275-289.

Schreck, C.B., 2010. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. *General Comparative Endocrinology*, 165, 549–556.

Vazirzadeh, A., Amiri, B. M., Yelghi, S., Hajimoradloo, A., Nematollahi, M. A., Mylonas, C. C., 2011. Comparison of the effects of different methods of mammalian and salmon GnRH administration on spawning performance in wild-caught female carp (*Cyprinus carpio carpio*) from the Caspian Sea. *Aquaculture*, 320, 123–128.

Von Ihering, R., Azevedo, P., 1936. A desova e a hipofiseação dos peixes. *Evolução de dois Nematognathas*. *Archivos do Instituto de Biologia*, 7, 107-118.

Zaniboni-Filho, E., Barbosa, N. D. C., 1996. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. *Revista Brasileira de Biologia*, 56, 655-659.
Zohar, Y. & C. C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197, 99-136.

Zaniboni-Filho, E., Weingartner, M., 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores (Induced breeding in migratory fishes). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31, 367-373.

Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General Comparative Endocrinology*, 165, 438–455.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes indutores hormonais na evolução do processo de maturação final e ovulação em *Leporinus macrocephalus*. Os animais (n = 42) foram submetidos à reprodução induzida através de injeções intramusculares dos seguintes hormônios: extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) aplicado em duas doses (0,5 e 5,0 mg kg⁻¹ com intervalo de 12 h entre as aplicações); hormônio liberador de gonadotrofina na forma líquida (mGnRH_a – L) aplicado em dose única (0,5 mg kg⁻¹); hormônio liberador de gonadotrofina na forma sólida (mGnRH_a – S) aplicado em dose única (0,5 mg kg⁻¹) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) aplicado em duas doses (5 e 10 UI g⁻¹ com intervalo de 12 h entre as aplicações). A administração de EBHC promoveu altas taxas de fertilização (63,57%) e eclosão (59,07%), porém apenas 71,4% das fêmeas ovularam. Por outro lado, o mGnRH_a – S promoveu elevado percentual de desova (100%), taxas de fertilização (93,75%) e eclosão (89,15%). O mGnRH_a – L apesar de ter causado 100% de ovulação, proporcionou baixas taxas de fertilização (6,25%) e eclosão (0%). Já os animais induzidos com hCG não ovularam (0%). A indução a desova com mGnRH_a – L e hCG causou uma rápida elevação na concentração plasmática dos esteroides gonadais (E₂ e 17α – OHP) após a primeira dose. Por outro lado, nos tratamentos EBHC e mGnRH_a – S observamos um aumento progressivo e regular nos níveis dos esteroides. O EBHC, permaneceu com um percentual elevado de ovócitos maduros com quebra da vesícula germinativa (GVBD) remanescente nos ovários (22,01%) e que não atingiram a ovulação. Por outro lado, a frequência de folículos pós – ovulatórios (FPO) nos tratamentos mGnRH_a – L (26,69%) e mGnRH_a – S (52,89%) aumentou após uma única dose hormonal. Assim, concluímos que a primeira dose de EBHC é responsável pela maturação final e a segunda dose pela ovulação. A indução a desova com hCG não é

capaz de induzir a maturação final e ovulação nesta espécie. Os hormônios mGnRHa – L e mGnRHa – S antecipam a maturação final e ovulação com apenas uma única dose.

Palavras – chave: Peixes reofílicos, reprodução induzida, desenvolvimento ovocitário, esteroides gonadais

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of different hormonal inductors in the progress of final maturation and ovulation in *Leporinus macrocephalus*. The animal (n = 42) were subjected to induced reproduction through intramuscular injections of following hormones: carp pituitary extract (CPE) injected in two doses (0,5 and 5,0 mg kg⁻¹ with a 12 h interval between the doses); gonadotropin releasing hormone in liquid form (mGnRH_a - L) injected with a single dose; gonadotropin releasing hormone in solid form (mGnRH_a - S) injected with a single dose and human chorionic gonadotropin (hCG) injected in two doses (5 and 10 UI g⁻¹ with a 12 h interval between the doses).

The administration of CPE promoted high fertilization (63.57%) and hatching rate (59.07%), but only 71.4% of the females ovulated. On the other hand, mGnRH_a - S promoted high spawning percentage (100%), fertilization (93.75%), and hatching (89.15%). The mGnRH_a - L although it caused a 100% ovulation, resulted low fertilization (6.25%), and hatching rates (0%). The induced with hCG cannot cause the ovulation (0%). Induction spawning with mGnRH_a - L and hCG caused a rapid increase in plasma concentrations of gonadal steroids (E₂ and 17 α - OHP) after the first dose. However, in animals induced with CPE and mGnRH_a - S observed a progressive increase and steady in steroid levels. The treatment CPE, despite have promoted high rates of fertilization and hatching, remained with a high percentage of mature oocytes with germinal vesicle breakdown (GVBD) remaining in the ovaries (22.01%) and who did not achieve ovulation. On the other hand, there was an increase in the frequency of follicles post - ovulatory (FPO) in the treatment mGnRH_a - L (26.69%) and mGnRH_a - S (52.89%) after administration of a single dose hormonal. Thus, we conclude that the first dose CPE is responsible for the final maturation and second dose by the ovulation. The induction spawning with hCG cannot cause the final maturation and ovulation in

this species. The hormones mGnRHa - L and mGnRHa - S anticipate the final maturation and ovulation with a single dose hormonal.

Key – words: Reophilic fish, induced breeding, oocyte development, gonadal steroids

1. INTRODUÇÃO

Na natureza a reprodução dos teleósteos é regulada por mecanismos endógenos (Zohar et al., 2010) aliados a estímulos ambientais que influenciam o processo de maturação dos ovócitos e ovulação (e.g. Migaud et al., 2004; Anguis & Cañavete, 2005; Hermelink et al., 2011). Porém, quando esses animais são mantidos em cativeiro ocorre uma disfunção no processo reprodutivo devido à ausência de estímulos ambientais (Mylonas et al., 2010), estresse do confinamento (Milla et al., 2009; Schreck, 2010) e baixos níveis hormonais (Mañanós et al., 2009). Assim, as espécies reofílicas mantidas em cativeiro são capazes de atingir a vitelogênese completa, no entanto, a maturação final e ovulação não ocorrem naturalmente (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010). Dessa forma, para completar essas etapas finais do processo reprodutivo é necessário a administração de hormônios exógenos (e.g. Batlouni et al., 2006; Romagosa, 2010; Cejko et al., 2012; Felizardo et al., 2012).

A técnica de indução hormonal mais utilizada para a ovulação de teleósteos em cativeiro é a hipofiseção (e.g. Dias et al., 2011; Honji et al., 2012; Nogueira et al., 2012). No entanto, esse método muitas vezes não é eficaz, resultando em falha na ovulação (e.g. Hainfellner et al., 2012a; Criscuolo-Urbinati et al., 2012), além de sua comercialização e utilização estar proibida em algumas regiões do Brasil, devido a questões sanitárias. Assim, a busca de novas alternativas para a obtenção de desova em teleósteos levou à procura de produtos sintéticos, como o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (e.g. Garber et al., 2009; Pham et al., 2010; Vazirzadeh et al., 2011) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Mousa, 2010; Cejko et al., 2012). Além disso, na tentativa de melhorar os resultados desfavoráveis da reprodução induzida, diversas variações de protocolos foram desenvolvidas, como a associação entre o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) ao hCG (Leonardo et al., 2004;

Rónyai, 2007) e ao análogo do hormônio luteinizante LHRH (Trung & Bart, 2007). Ainda na busca de melhores resultados é utilizado a aplicação de uma dose extra de EBHC (dose preparatória) dias ou semanas antes do tratamento convencional (Zaniboni-Filho & Barbosa, 1996; Tanaka et al., 2003). Assim, diversas tentativas de melhorar a reprodução induzida foram desenvolvidas utilizando diferentes protocolos (e.g. Agulleiro et al., 2006; Heyrati et al., 2007; Targońska & Kucharczyk, 2011; Cejko et al., 2012). Porém, o verdadeiro problema ainda não foi diretamente abordado, pois não é conhecido o papel das doses hormonais no processo de retomada da meiose e ovulação em teleósteos reofílicos. Nestas espécies, as diversas variações de protocolos não levaram em consideração o que realmente ocorre no interior dos ovários, tratando-se de propostas baseadas no método “tentativa e erro”.

A técnica de reprodução induzida é a base para o sucesso da produção de inúmeras espécies de teleósteos e traz vantagens consideráveis para o cultivo (Zohar & Mylonas, 2001; Mylonas et al, 2010; Targońska et al., 2012). No entanto, a falta de informações básicas sobre o efeito dos diferentes hormônios na reprodução tem ocasionado prejuízos na produção de teleósteos de interesse comercial. Assim, estudos que mostram o que ocorre no interior dos ovários dos animais sob efeito de indutores hormonais são importantes, pois auxiliará na elaboração de protocolos efetivos e específicos para cada espécie. Assim, o objetivo foi descrever o efeito de diferentes indutores hormonais na evolução do processo de maturação final e ovulação em *Leporinus macrocephalus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Manutenção dos peixes*

Foram utilizados 42 adultos de *L. macrocephalus* com massa corporal de $2,5 \pm 0,9$ kg (média \pm desvio padrão), os animais foram provenientes do Centro de Aquicultura da Unesp. Machos e fêmeas (proporção sexual de 1:1) foram mantidos durante 24 meses em viveiros escavados de 200 m² em uma densidade de estocagem de 1,5 m³. Os peixes foram alimentados com ração comercial para reprodutores com 32% de proteína bruta (min.); 10% extrato etéreo (min.); 5% matéria fibrosa (max.); 7% de cinza (max.); 10% cálcio (max.) e 1,2% fósforo (min.) fornecida duas vezes ao dia (8:00 e 17:00 h) a 3% da biomassa. Os parâmetros físicos e químicos da água dos viveiros foram monitorados semanalmente (média \pm desvio padrão), com medições do pH ($7,75 \pm 0,5$), condutividade elétrica ($70,33 \pm 17,95$ mS/cm), concentração de oxigênio dissolvido ($5,64 \pm 1,42$ mg L⁻¹) e concentração de amônia total ($67,47 \pm 50,86$ µg L⁻¹). A temperatura da água ($23,8 \pm 3,16$ °C) foi aferida diariamente.

2.2. *Indução a desova*

Para a indução a desova, somente peixes em estágio avançado de maturação gonadal foram utilizados. As fêmeas foram selecionadas por características morfológicas externas como ventre abaulado, macio e papila urogenital saliente e nos machos a fluidez de sêmen através de massagem abdominal, realizada no sentido antero-posterior (Woynarovich e Horváth, 1989).

Os peixes selecionados foram transferidos para o laboratório, separados de acordo com o sexo, e mantidos em tanques de 1000 L (1 peixe. 250 L⁻¹) antes da desova. As fêmeas foram submetidas à indução a desova através de injeções intramusculares dos seguintes hormônios (tratamentos): **EBHC**: Extrato bruto de hipófise de carpa (Fish braz[®]) – aplicado em duas doses (0,5 e 5,0 mg kg⁻¹, diluído em 0,5 mL de soro

fisiológico – 0,9%), com intervalo de 12 h entre as aplicações; **mGnRHa – L:** Hormônio liberador de gonadotrofina na forma líquida (Conceptal[®]/ Intervet) – aplicado em dose única (0,5 mg kg⁻¹, diluído em ~10 mL de diluente estéril tamponado). Foi utilizado um inibidor dopaminérgico (10 mg kg⁻¹ de metoclopramida, diluído em 0,5 mL de soro fisiológico – 0,9%); **mGnRHa – S:** Hormônio liberador de gonadotrofina na forma sólida (Ovopel[®]/ Interfish) – aplicado em dose única (0,5 mg kg⁻¹, diluído em 0,5 mL de soro fisiológico – 0,9%). Cada glóbulo do produto contém 10 mg de metoclopramida (inibidor dopaminérgico); **hCG:** Gonadotrofina coriônica humana (Chorulon[®]/ Intervet) – aplicado em duas doses (5 e 10 UI g⁻¹, diluído em ~15 mL de diluente estéril tamponado), com intervalo de 12 h entre as aplicações.

Os machos selecionados foram induzidos com uma única dose de EBHC (2,5 mg kg⁻¹). A mistura dos ovócitos com o sêmen foi realizada a “seco” de acordo com a metodologia descrita por Von Ihering & Azevedo (1936). Aproximadamente 0,5 mL de sêmen foi utilizado para fertilizar 50 g de ovócitos (*e.g.* Criscuolo-Urbinati et al., 2012). A fertilização foi feita com um *pool* de sêmen dos machos e os ovos de cada fêmea foram distribuídos (150 g) em incubadoras (200 litros) com fluxo constante de água (5 L. min⁻¹) e concentração de oxigênio dissolvido de 5,72 ± 0,84 mg L⁻¹.

2.3. Desempenho Reprodutivo

2.3.1. Período de latência e percentual de desova

O período de latência foi estimado após a primeira dose hormonal através do tempo médio entre a primeira aplicação hormonal e a ovulação, como descrito por Heyrati et al., (2006). O percentual de desova foi definido por: (número total de fêmeas que desovaram / número total de fêmeas injetadas X 100), como descrito por Vazirzadeh et al., (2011).

2.3.2. Taxa de fertilização e eclosão

Para avaliar a taxa de fertilização, 100 ovos foram coletados das incubadoras aleatoriamente e contados 8 horas pós-fertilização (após a fase de fechamento do blastóporo), somente aqueles que estavam dividindo normalmente foram contabilizados (não gorados). Quatro contagens foram realizadas para determinar a taxa de fertilização, como descrito por Hainfellner et al., (2012b). A taxa de eclosão foi realizada 17 horas pós-fertilização, foram contados o número de ovos eclodidos / número de ovos fertilizados X 100. Quatro contagens foram realizadas para determinar a taxa de eclosão, como descrito por Criscuolo-Urbinati et al., (2012).

2.3.3. Fecundidade absoluta e índice gonadossomático

Para calcular a fecundidade absoluta (FA), o número total de ovócitos liberados foi pesado e uma amostra de 1g foi coletada para estimar o número total de ovócitos (4 réplicas). Assim, a fecundidade absoluta foi determinada pela seguinte fórmula: FA = (número ovócitos por grama X peso total da desova), como descrito por Arantes et al., (2011).

Após a desova, as fêmeas foram eutanasiadas com dose letal de benzocaína (2 g L^{-1}) para a coleta dos ovários. O índice gonadossomático (IGS) foi determinado pela seguinte fórmula: IGS = (peso total de ovócitos liberados por cada fêmea + peso dos respectivos ovários remanescentes / peso total do peixe X 100), como descrito por Romagosa et al., (2010).

2.4. Avaliação do estágio de maturação gonadal por meio de canulação

Para avaliar o estágio de maturação gonadal das fêmeas, amostras de ovócitos intra-ovárias foram coletadas antes da indução hormonal. Para isso, utilizou-se uma cânula (sonda uretral nº 8) que foi inserida na papila urogenital dos animais. As amostras (~100 ovócitos) foram retiradas das cânulas e colocadas em líquido de Serra (e.g. Felizardo et

al., 2012) para tornar os ovócitos translúcidos e assim, permitir a visualização da posição do núcleo. A descrição da posição dos núcleos foi realizada imediatamente após a fixação, através de um estereomicroscópio de luz (objetiva 10 X). Avaliou-se a porcentagem de diferentes tipos de ovócitos: ovócitos com núcleo central (NC), ovócitos com núcleo excêntrico ou migrado (NE) e ovócitos sem núcleo (SN). Para esta análise foi utilizado o método descrito por Leonardo et al., (2004).

2.5. Hidratação dos ovos

Para a avaliação do processo de hidratação, um *pool* de ovócitos do mesmo tratamento foi fertilizado com um *pool* de sêmen de machos do plantel (n = 7). A hidratação foi avaliada após a fertilização coletando-se 30 ovócitos em diferentes períodos (0, 5, 10, 40, 120 e 600 segundos). Para promover o processo de hidratação os ovos (10 mL) de cada tratamento foram distribuídos em recipientes com água (100 mL). O tempo foi cronometrado a partir do momento em que o ovo entrava em contato com a água, iniciando o processo de hidratação. Após a hidratação, os ovos foram fixados em solução de Karnovsky por 24 horas e conservados em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. O diâmetro dos ovos foi posteriormente medido para avaliar a hidratação utilizando um estereomicroscópio (LEICA MZ8) acoplado ao equipamento automático de fotomicrografia (LEICA DFC 280), com software para medição Image-Pro Plus Versão 4.1.0.0.

2.6. Morfologia dos ovários

Para as análises morfológicas os animais (n =) foram eutanasiados com dose letal de benzocaína (2 g L^{-1}) antes da segunda dose hormonal e após a ovulação. Amostras dos ovários das regiões cranial, média e caudal foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas e submetidas a rotinas histológicas. O material fixado foi incluído em historesina (Historesin Plus, Leica, Heidelberg, Germany) cortado com espessura de $2\mu\text{m}$ e corado

com Hematoxilina - Floxina. A classificação dos ovócitos foi realizada de acordo com o método utilizado por Criscuolo-Urbinati et al., (2012). Os diferentes tipos de ovócitos foram classificados em: pré - vitelogênico (PV), alvéolo cortical (AC), vitelogênico imaturo (VI), vitelogênico maduro com núcleo central (VNC), vitelogênico maduro com núcleo migrado (VNM), vitelogênico maduro com quebra da vesícula germinativa (GVBD) e atrésico (AT) (Fig. 2). O aparecimento de folículos pós-ovulatórios (FPO) e tecido intersticial (TI) também foi caracterizado (Fig. 2). Para a descrição dos ovócitos, utilizou-se um microscópio Olympus BX41 (objetivas de 4 X) com sistema de captura de imagens (Olympus DP11).

2.7. Migração da vesícula germinativa

A migração da vesícula germinativa (núcleo) até o momento de seu rompimento (quebra da vesícula) foi descrito em distintas etapas do processo de maturação dos ovócitos. Para isso, amostras histológicas das regiões (cranial, média e caudal) dos ovários foram analisadas em um microscópio Olympus BX41 (objetivas de 4 X) com sistema de captura de imagens (Olympus DP11). Todo o processo de migração da vesícula germinativa até o rompimento do núcleo foi caracterizado independentemente dos tratamentos (Fig. 3).

2.8. Coleta de sangue e dosagem hormonal

Os animais foram capturados e anestesiados com benzocaína (9 mg L^{-1}) como recomendado por Gontijo et al. (2003). O sangue foi coletado utilizando-se agulhas hipodérmicas e seringas heparinizadas (Liquemine, Roche, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em diferentes períodos após a indução hormonal. A primeira amostra foi coletada minutos antes da primeira dose hormonal, a segunda amostra minutos antes da segunda dose hormonal e a terceira amostra logo após a ovulação. Nos peixes do tratamento mGnRH α - L e mGnRH - S foram coletadas amostras somente antes da única dose

hormonal e após a ovulação, pois esses animais receberam apenas uma única dose hormonal. O sangue foi retirado por punção da vasculatura caudal e centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos. O plasma foi separado e congelado a -80° C para posterior dosagem de estradiol (E_2) e 17α – hidroxiprogesterona (17α – OHP). A dosagem hormonal foi realizada pelo método de ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay (E_2 e 17α -OHP: Interteck, Virginia, USA) validado para o *L. macrocephalus*, de acordo com o método descrito por Brown et al., (2004). As amostras de plasma foram analisadas em duplicata e as validações de ambos os kits (E_2 e 17α -OHP), foram determinados através do cálculo dos coeficientes inter-ensaio de variação (% CV) e o pico de recuperação (%). O limite aceitável para o CV inter-ensaio foi $\leq 20,0\%$ e para o pico de recuperação, de 90 – 110 % (Brown et al., 2004). As medições de absorbância foram realizadas utilizando um leitor de microplacas (Molecular Devices, CA, EUA).

2.9. Volume de densidade dos ovócitos

O volume de densidade foi determinado através de um microscópio de luz e um *grid* com 320 pontos. Três campos microscópicos (objetiva 4x) de cada região do ovário (cranial, média e caudal, nove campos no total), foram selecionados aleatoriamente, totalizando 2.880 pontos obtidos para cada animal. Foram computados os pontos sobre os diferentes tipos de ovócitos, folículos pós-ovulatórios e tecido intersticial. A porcentagem de cada estrutura ovariana foi calculada entre os tratamentos antes da segunda dose e após a ovulação através da seguinte fórmula: (n° pontos X 100/ total de pontos). O método utilizado para contagem foi o mesmo utilizado por Criscuolo-Urbinati et al., (2012). Artefatos de técnica foram raramente vistos e, portanto, não foram consideradas no total de números de pontos para obter as percentagens finais.

3.0. Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Cramer-von Mises (Zar, 1999). A homogeneidade da variância foi verificada por meio do teste de Fmax. Quando a normalidade não foi encontrada, os dados foram transformados em raiz quadrada. Foi utilizado *one-way* ANOVA para analisar os diferentes tipos de ovócitos obtidos por meio da canulação ovariana, o volume de densidade e todos os parâmetros de desempenho reprodutivo, exceto o percentual de desova que foi analisado através do teste de Qui – quadrado (X^2). Para analisar, a hidratação dos ovos e os esteroides gonadais foi utilizado *two-way* ANOVA para medidas repetidas. O teste de Tukey foi utilizado como análise *post hoc*. Foi utilizado $p \leq 0,05$ para inferir significância estatística. O pacote estatístico utilizado foi o SAS versão 9.0.

3.1. Nota Ética

Este estudo foi conduzido de acordo com os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (<http://www.cobea.org.br>) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, protocolo (015279/10).

4. RESULTADOS

4.1. Desempenho Reprodutivo

O período de latência da desova oscilou entre 10 – 19 horas após a primeira dose hormonal (Tabela 1). Os maiores valores foram observados no tratamento EBHC (19,34 h), enquanto que menores períodos foram observados nos tratamentos mGnRH α – L (12 h) e mGnRH α – S (10,5 h) (*one-way* ANOVA, $p < 0,0001$). Foi observado maior percentual de desova nos tratamentos mGnRH α -L e mGnRH α -S (100%), seguido pelos tratamentos EBHC (71,4%) e hCG (0%) (Teste Qui-quadrado, $p = 0,0062$). Foram observadas as maiores taxas de fertilização nos tratamentos mGnRH α -S (93,75%) e

EBHC (63,57%) em comparação aos demais tratamentos (*one-way* ANOVA, $p = 0,0004$). A taxa de eclosão foi maior nos tratamentos mGnRHa-S (89,15%) e EBHC (59,07%) em comparação aos demais tratamentos (*one-way* ANOVA, $p = 0,0002$). Não foram observadas diferenças significativas na fecundidade absoluta (*one-way* ANOVA, $p = 0,1015$) e no IGS (*one-way* ANOVA, $p = 0,1571$) entre os tratamentos.

4.2. Avaliação dos tipos de ovócitos por meio de canulação ovariana

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos no percentual dos diferentes tipos de ovócitos vitelogênicos (NC, NE e SN) antes da indução hormonal (*one-way* ANOVA, $p = 0,27$; Tabela 2).

4.3. Hidratação dos ovos

O diâmetro dos ovos foi maior nos tratamentos EBHC e mGnRHa - S quando comparado ao tratamento mGnRHa - L nos diferentes períodos avaliados (*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p < 0,0001$, Fig. 1).

4.4. Morfologia dos ovários

A descrição dos ovócitos de *L. macrocephalus* induzidos à reprodução através de diferentes indutores hormonais estão apresentadas na tabela 3. Em todos os tratamentos foram observados os ovócitos: PV, AC, VI, VNC, VNM, GVBD, AT. Observou-se também a presença de FPO (exceto no tratamento hCG) e TI (Fig. 2).

4.5. Migração da vesícula germinativa

Antes de iniciar a migração o núcleo fica posicionado centralmente no ovócito (Fig. 3A). A migração da vesícula germinativa em direção a região da micrópila (pólo animal) teve início após a indução hormonal (Fig. 3B). Após a migração completa da vesícula germinativa (Fig. 3C e 3D) foi observado o início da ruptura do envoltório nuclear (Fig. 3E) e a perda do formato esférico regular que possuía antes do início deste

processo (Fig. 3F e 3G). Concluída a maturação final, iniciou o processo de ovulação com a liberação dos ovócitos dos folículos ovarianos (Fig. 3H).

4.6. Esteroides gonadais

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis plasmáticos de E₂ entre os tratamentos antes da indução hormonal (*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p = 0,6112$). No entanto, antes da segunda dose hormonal os níveis plasmáticos de E₂ foi maior no tratamento hCG em comparação ao EBHC (*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p = 0,0426$). Após a ovulação os tratamentos EBHC, mGnRHa – S e hCG apresentaram altos níveis de E₂ comparado ao tratamento mGnRHa – L (*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p = 0,0332$). Foram observadas diferenças significativas na variação do E₂ entre os diferentes períodos de coleta dentro dos tratamentos EBHC (*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p = 0,009$); mGnRHa – L (*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p = 0,0161$); mGnRHa – S (*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p = 0,0002$) e hCG (*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p = 0,0449$).

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis plasmáticos da 17 α – OHP entre os tratamentos antes da indução hormonal (*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p = 0,1789$). No entanto, a concentração plasmática da 17 α – OHP foi maior no tratamento hCG antes da segunda dose hormonal comparado ao EBHC (*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p = 0,0004$). Após a ovulação os maiores valores da 17 α – OHP foram observados no tratamento EBHC comparado aos demais tratamentos (*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p < 0,0001$). Foram observadas diferenças significativas na concentração plasmática da 17 α – OHP entre os diferentes períodos de coleta dentro dos tratamentos EBHC (*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p = 0,0014$), mGnRHa – L (*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p = 0,0182$) e hCG

(*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p = 0,0412$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas na concentração plasmática da 17α – OHP entre os diferentes períodos de coleta no tratamento mGnRHa – S (*two-way* ANOVA para medidas repetidas, $p = 0,6590$).

4.7. Volume de densidade dos ovócitos

4.7.1. Antes da segunda dose

Não foram observadas diferenças estatísticas na frequência dos ovócitos PV (*one-way* ANOVA, $p = 0,0997$; Fig. 4); AC (*one-way* ANOVA, $p = 0,1453$; Fig. 4); VI (*one-way* ANOVA, $p = 0,2108$; Fig. 4); FPO (*one-way* ANOVA, $p = 0,5621$; Fig. 4); AT (*one-way* ANOVA, $p = 0,8911$; Fig. 4) e no TI (*one-way* ANOVA, $p = 0,0709$; Fig. 4) entre os tratamentos EBHC e hCG. No entanto, elevada frequência de ovócitos VNC (*one-way* ANOVA, $p = 0,0001$; Fig. 4) foi observada no tratamento hCG. Enquanto que, a frequência dos ovócitos VNM (*one-way* ANOVA, $p = 0,0005$; Fig. 4) e GVBD (*one-way* ANOVA, $p = 0,0002$; Fig. 4) foram maiores no tratamento EBHC quando comparado ao tratamento hCG.

4.7.2. Após a ovulação

Para a avaliação da frequência dos ovócitos após a ovulação, utilizou-se somente ovários de peixes que ovularam, assim os animais do tratamento hCG não foram comparados com os demais tratamentos. Dessa forma, foi realizada somente uma análise descritiva da frequência dos ovócitos no tratamento hCG.

Não foram observadas diferenças estatísticas nas frequências dos ovócitos PV (*one-way* ANOVA, $p = 0,1634$; Fig. 5), AC (*one-way* ANOVA, $p = 0,6393$; Fig. 5), VI (*one-way* ANOVA, $p = 0,2983$; Fig. 5), VNC (*one-way* ANOVA, $p = 0,0630$; Fig. 5), VNM (*one-way* ANOVA, $p = 0,3547$; Fig. 5), AT (*one-way* ANOVA, $p = 0,6505$; Fig. 5) e no TI (*one-way* ANOVA, $p = 0,5633$; Fig. 5) entre os tratamentos. No entanto, a frequência

do ovócito GVBD foi maior no tratamento EBHC (*one-way* ANOVA, $p = 0,0150$; Fig. 5) e a frequência de FPO maior no tratamento mGnRHa – S, quando comparado aos demais tratamentos (*one-way* ANOVA, $p < 0,0001$; Fig. 5).

No tratamento hCG, mesmo após a administração das duas doses hormonais, foi observado que os animais permaneceram com altas frequências de ovócitos VNC ($34,51\% \pm 5,06$).

5. DISCUSSÃO

Este estudo fornece novas informações sobre o efeito de diferentes indutores hormonais no processo de retomada da meiose e ovulação em teleósteos. Observamos, com os protocolos utilizados que a primeira dose hormonal de EBHC é responsável pela maturação final e a segunda dose pela ovulação. Enquanto que uma única dose hormonal dos hormônios mGnRHa – L e mGnRHa – S é o suficiente para promover a maturação final e a ovulação. A formulação de hCG utilizada neste estudo não foi capaz de induzir a maturação final e ovulação da espécie. As formulações comerciais sintéticas de mGnRHa apresentam numerosas variações de composição e, na maioria das vezes, estão associadas a distintas concentrações de inibidores dopaminérgicos. Por apresentarem inúmeras vantagens em relação ao EBHC, principalmente por possuírem dose exata e promoverem altas taxas de ovulação, estes podem substituir futuramente o uso de EBHC.

Segundo Heyrati et al., (2007), a eficácia de tratamentos hormonais pode ser medida através do percentual de desova e da taxa de fertilidade dos animais. Dessa forma, o elevado percentual de desova (100%) e as altas taxas de fertilização (93,75%) e eclosão (89,15%) observadas no tratamento mGnRHa – S demonstra a eficácia deste hormônio no processo reprodutivo da espécie e sua possível função na maturação final e ovulação. O sucesso obtido no desempenho reprodutivo com a utilização do mGnRHa – S é

similar ao encontrado em estudos com outros teleósteos (e.g. Kujawa et al., 2011; Targońska & Kucharczyk, 2011; Cejko et al., 2012). Esses resultados estão relacionados com a função do mGnRHa em atuar na hipófise estimulando a produção de hormônios gonadotróficos (FSH e LH endógeno) (Zohar & Mylonas, 2001; Chen & Fernald, 2008), exercendo, dessa forma, grande importância na regulação do processo de gametogênese (Madigou et al., 2002; Onuma et al., 2005).

O mGnRHa, devido sua ação hipofisária, também proporciona uma estimulação mais adequada dos eventos reprodutivos e melhor integração com outras funções fisiológicas que afetam a reprodução (Rónyai, 2007). Os melhores resultados obtidos com mGnRHa – S em comparação ao mGnRHa – L pode ser devido a este hormônio apresentar formulações sólidas (glóbulos). Assim, volumes menores (~ 0,5 mL) podem ser administrados nos peixes durante a indução a reprodução. Por outro lado, o mGnRHa – L apesar de ter causado altas taxas de ovulação (100%), proporcionou baixa fertilidade (6,25%) e eclosão (0%). Esses resultados negativos podem estar relacionados à alta quantidade de líquido que precisa ser administrado nos animais (~ 10 mL). Resultados similares foram obtidos em *Colossoma macropomum* (Acuña & Rangel, 2009) e em *Rhamdia quelen* (Carneiro & Mikos, 2008), estes autores também utilizaram formulações líquida de mGnRHa para a indução a desova. No tratamento EBHC também foram observadas altas taxas de fertilidade (63,57%) e eclosão (59,07%), porém este hormônio não foi capaz de induzir a ovulação na totalidade das fêmeas injetadas (71,4%). A falta de ovulação de algumas fêmeas do tratamento EBHC pode ser atribuída ao fato das gonadotrofinas atuarem apenas nas gônadas (Szabó et al., 2002), e não serem endógenas (FSH e LH de animais doadores). Assim, o EBHC pode não conter a quantidade conhecida e exata de hormônios (FSH e LH) e, portanto, apresentar um efeito menos eficaz comparado ao mGnRHa (Yaron, 1995; Zohar &

Mylonas, 2001). Além disso, o EBHC possui hormônios de crescimento, osmorreguladores, entre outros, o que provoca elevado estresse nos indivíduos receptores (Mylonas et al., 2010), e que provavelmente causa falhas na ovulação. A utilização do hCG para a indução a maturação final e ovulação desta espécie não foi eficiente, pois os animais induzidos não desovaram (0%). Observamos macroscopicamente que as gônadas dos animais induzidos com hCG ocupavam toda a cavidade abdominal, com aspecto sanguinolento e ovócitos de coloração esbranquiçada. O sucesso com o uso do hCG na reprodução induzida de peixes reofílicos já foi documentado (*e.g.* Leonardo et al., 2004; Mousa et al., 2010; Źarski et al., 2011). Dessa forma, o insucesso obtido neste estudo com a utilização deste hormônio pode estar vinculado à espécie utilizada, assim como a dosagem administrada, pois existem diversas variações de protocolos (dosagens) e respostas dos teleósteos mediante sua administração (Leonardo et al., 2004; Mousa, 2010; Cejko et al., 2012).

A coleta de ovócitos através da técnica de canulação não causou lesões traumáticas no tecido ovariano dos animais, pois através dos cortes histológicos dos ovários não foi observado à presença de lesões. Esta técnica tem sido amplamente utilizada para avaliar a maturação gonadal de peixes (*e.g.* Leonardo et al., 2004; Targońska & Kucharczyk, 2011; Vazirzadeh et al., 2011) sem causar prejuízos à reprodução. A ausência de diferenças estatísticas observada na frequência dos ovócitos NC, NE e SN entre os tratamentos demonstraram que os mesmos não interferiram nos resultados de indução a desova e que as fêmeas utilizadas apresentavam estágio de maturação gonadal semelhante.

A hidratação está relacionada com a capacidade do ovo em absorver água por osmose devido à presença de canais moleculares de água (King et al., 2004; Fabra et al., 2005) e ao aumento da pressão osmótica (Fabra et al., 2006). Dessa forma, é provável

que a hidratação de baixa intensidade verificada no tratamento mGnRHa – L possa estar relacionado ao longo período que os ovócitos permaneceram ovulados, e sem contato com a circulação sanguínea (hipóxia). É relatado que os ovócitos quando liberados na cavidade abdominal perdem o seu fornecimento de oxigênio e eventualmente sofrem danos (Marino et al., 2003). Neste tratamento a proposta foi realizar a extrusão dos animais 12 horas após a indução hormonal, no entanto a dose utilizada provocou a ovulação dos animais antes deste período (10 h). Dessa forma, não foi possível prever o momento exato da extrusão dos animais, o que pode ter prejudicado o desenvolvimento dos ovócitos.

A descrição do processo de migração da vesícula germinativa foi semelhante ao observado para outras espécies de teleósteos (*e.g.* França et al., 2010; Arantes et al., 2011). As análises histológicas demonstraram que algumas horas após a indução hormonal ocorre a quebra da vesícula germinativa (Lubzens et al., 2010; Żarski et al., 2012). Neste processo, a vesícula germinativa migra para a periferia do ovócito e ocorre o rompimento do envoltório nuclear (França et al., 2010; Arantes et al., 2011). Assim, o ovócito perde o formato esférico regular e central que possuía antes do início deste processo (Nagahama & Yamashita, 2008). Concluída a maturação final, inicia-se o processo de ovulação com a liberação dos ovócitos dos folículos ovarianos (Lubzens et al., 2010; Nagahama & Yamashita, 2008).

A rápida elevação na concentração plasmática dos esteroides gonadais nos tratamentos mGnRHa – L e hCG logo após a primeira dose, está associada à capacidade do hormônio mGnRHa – L em atuar diretamente na hipófise (Chen & Fernald, 2008; Zohar et al., 2010) e do hCG nos ovários (Aizen et al., 2012), induzindo uma liberação mais rápida e intensa dos esteroides gonadais (Nagahama & Yamashita, 2008; Mylonas et al., 2010). A elevação dos esteroides gonadais pode estar relacionada com a

estimulação excessiva do eixo hipotálamo – hipófise – gônadas, o que pode estar prejudicando a viabilidade dos gametas nestes tratamentos. Por outro lado, nos animais induzidos com EBHC e mGnRH – S observamos um aumento progressivo e regular nos esteroides, principalmente da 17α – OHP, que é o precursor da $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, o qual participa ativamente do processo de ovulação (Nagahama & Yamashita, 2008). Dessa forma, é possível que esta elevação lenta e gradativa dos esteroides seja necessária para produção de ovos viáveis nesta espécie.

As análises morfométricas dos ovários revelaram que a primeira dose de EBHC causou um aumento na frequência de ovócitos VNM (29,92%) e GVBD (31,03%), indicando que a primeira dose foi responsável somente pela maturação final, enquanto que, a segunda dose causou ovulação dos animais. No entanto, os animais deste tratamento permaneceram com elevada frequência de ovócitos GVBD (22,01%) remanescente nos ovários, mesmo após a ovulação. Estes ovócitos por apresentarem quebra da vesícula germinativa e estágios finais de desenvolvimento deveriam ser liberados durante a ovulação (*e.g.* Nagahama & Yamashita, 2008; Patiño & Sullivan, 2002). Porém, altas porcentagens de ovócitos GVBD ficaram aderidos ao ovário das fêmeas, indicando que a indução a reprodução, com protocolos convencionais de EBHC, promove uma ovulação menos intensa comparado aos tratamentos mGnRH_a – L e mGnRH_a – S. Resultados similares foram observados em *Brycon amazonicus* (Hainfellner et al., 2012a) e em *Piaractus mesopotamicus* (Criscuolo-Urbinati et al., 2012). Estes autores também constataram elevadas frequências de ovócitos GVBD remanescente nos ovários após a indução com EBHC. Por outro lado, foi observado um aumento significativo na frequência de FPO nos tratamentos mGnRH_a – L (30,17%) e mGnRH_a – S (52,89%) após a administração de uma única dose hormonal. Esses resultados sugerem que estes hormônios intensificam o processo maturação final e

ovulação dos animais com apenas uma única dose. Isto é provavelmente devido ao mGnRH causar uma liberação rápida e elevada de FSH e LH endógeno na circulação após a indução hormonal (e.g. Amano et al., 2002; Mañanós et al., 2002) e consequentemente um aumento na concentração plasmática dos esteroides (Zohar et al., 2010). Os animais do tratamento hCG permaneceram com alta frequência de ovócitos VNC (37,89%) mesmo após a indução hormonal, demonstrando que as doses utilizadas não foram capazes de causarem a maturação final e a ovulação. Embora a eficiência do hCG seja comprovada na maturação final e ovulação de teleósteos (e.g. Mousa & Mousa, 2006; Legendre et al., 2012), algumas espécies podem apresentar resposta imune, produzindo antígenos contra o hCG e assim causar uma diminuição na qualidade dos gametas (Van Der Kraak et al., 1989; Zohar & Mylonas, 2001).

Em conclusão, os resultados demonstram que os indutores hormonais e suas respectivas doses causam distintos resultados na maturação final e ovulação de *L. macrochepalus*. A primeira dose de EBHC é responsável pela maturação final e a segunda dose pela ovulação. O mGnRH_a – L promove a maturação final e a ovulação com uma única dose hormonal. O mGnRH_a – S também foi capaz de causar a maturação final e a ovulação com uma única dose hormonal, mas ao contrário do mGnRH_a – L, proporcionam uma estimulação mais adequada dos eventos reprodutivos e produzem ovos viáveis. O insucesso da indução com hCG provavelmente está relacionado com a espécie e a dosagem utilizada, pois este hormônio não foi capaz de causar a maturação final e ovulação. Assim, neste estudo demonstramos que existem particularidades na evolução do processo de maturação final e ovulação quando distintos protocolos de indução hormonal são aplicados. Observamos que apesar de menos eficaz, o uso de EBHC ainda é necessário, pois pouco se sabe sobre o uso de hormônios sintéticos em teleósteos nativos. No entanto, o uso de formas sólidas de

mGnRHa sintético surgem como interessantes alternativas para a indução hormonal e podem ajudar a mitigar o ponto mais falho do processo reprodutivo das espécies migradoras, a ovulação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuña, J.J.A & Rangel, J.L.H. , 2009. 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*, 19, 486 – 494.

Agulleiro, M. J., V. Anguis, J. P. Canavate, G. Martinez-Rodriguez, C. C. Mylonas., J. Cerda., 2006. Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. *Aquaculture*, 257, 511-524.

Aizen, J., M. Kobayashi, I. Selicharova, Y. C. Sohnd, G. Yoshizaki., B. Levavi-Sivan. 2012. Steroidogenic response of carp ovaries to piscine FSH and LH depends on the reproductive phase. *General and Comparative Endocrinology*, 178, 28 - 36.

Amano, M., Takahashi, A., Yamanome, T., Okubo, K., Aida, K. & Yamamori, K., 2002. Molecular cloning of three cDNAs encoding different GnRHs in the brain of barfin flounder. *General and Comparative Endocrinology*, 126, 325-333.

Anguis, V., Cañavate, J. P., 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture*, 243, 133–145.

Arantes, F. P., Santos, H. B., Rizzo, E., Sato, Y., Bazzoli, N., 2011. Influence of water temperature on induced reproduction by hypophysation, sex steroids concentrations and final oocyte maturation of the “curimatã-pacu” *Prochilodus argenteus* (Pisces: Prochilodontidae). *General and Comparative Endocrinology*, 172, 400–408.

Batlouni, S. R., E. Romagosa., M. I. Borella. 2006. The reproductive cycle of male catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium. An approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction Science*, 96, 116-132.

Brown, J., Walker, S. E., Steinmain, K., 2004. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. Conservation and Research Center, Smithsonian’s National Zoological Park, Front Royal, Virginia – EUA, 93 p.

Carneiro, P. C. & Mikos, J. D., 2008. Gonadotrofina coriônica humana e hormônio liberador de gonadotrofina como indutores da reprodução do jundiá. *Acta Scientiarum Animal Science*, 30, 345-350.

Cejko, B. I., Targonska, K., Kowalski, R. K., Żarski, D., Sarosiek, B., Kucharczyk, D., Glogowski, j., 2012. The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). *Journal Applied Ichthyology*, 28, 873–877.

Chen, C. C. & Fernald, R. D., 2008. GnRH and GnRH receptors: distribution, function and evolution. *Journal of Fish Biology*, 73, 1099–1120.

Criscuolo – Urbinati, E., Kuradomi, R. Y., Urbinati, E. C., Batlouni, S. R. 2012. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Theriogenology*, 78, 2087 – 2094.

Dias, D. C., A. F. G. Leonardo, L. Tachibana, C. F. Correa, I. C. A. C. Bordon, E. Romagosa, M. J. T. Ranzani – Paiva. 2011. Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxá (*Brycon amazonicus*) breeders. *Journal Applied Ichthyology*, 28: 40 – 45.

Fabra, M., Raldúa, D., Bozzo, M.G., Deen, P.M.T., Lubzens, E., Cerdà, J., 2006. Yolk proteolysis and aquaporin-10 play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption. *Developmental Biology*, 295, 50–262.

Fabra, M., Raldúa, D., Power, D.A., Deen, P.M.T., Cerdà, J., 2005. Marine fish egg hydration is aquaporin-mediated. *Science*, 307, 545.

Felizardo, V. O., Murgas, L. D. S., Andrade, E. S., López, P. A., Freitas, R. T. F., Ferreira, M. R., 2012. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). *Theriogenology*, 77, 1570–1574.

França, G. F., Grier, H. J., Quagio-Grassiotto, I., 2010. A new vision of the origin and the oocyte development in the ostariophysii applied to *Gymnotus sylvius* (Teleostei, Gymnotiformes). *Neotropical Ichthyology*, 8, 787-804.

Garber, A. F., Fordham, S. E., Symonds, J. E., Trippel, E. A., Berlinsky, D. L., 2009. Hormonal induction of ovulation and spermiation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 296, 179–183.

Gontijo, A.M., Barreto, R.E., Speit, G., Reyes, V.A.V., Volpato, G.L., Salvadori, D.M.F., 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutation Research*, 534, 165-172.

Hainfellner, P., M. E. Munõz, T. G. De Souza, G. A. Freitas, S. R. Batlouni. 2012a. Spawning failure in *Brycon amazonicus* may be associated with ovulation and not with final oocyte maturation. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64, 515 – 517.

Hainfellner, P., T. G. Souza, R. G. Moreira, L. S. O. Nakaghi & S. R. Batlouni. 2012b. Low estradiol levels, delayed vitellogenesis and reduced amounts of yolk are dysfunctions associated with the formation of low quality oocytes in *Prochilodus lineatus* (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology*, 10, 601 – 612.

Hermelink, B., Wuertz, S., Trubiroha, A., Rennert, B., Kloas, W., Schulz, C., 2011. Influence of temperature on puberty and maturation of pikeperch, *Sander lucioperca*. *General and Comparative Endocrinology*, 172, 282–292.

Heyrati, F. P., Mostafavi, H., Toloe, H., Dorafshan, S., 2007. Induced spawning of kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) using (D-Ala6, Pro9-NEt) GnRHα combined with domperidone. *Aquaculture*, 265, 288–293.

Honji R. M., C. E. Tolussi, P. H. Mello, D. Caneppele, R. G. Moreira. 2012. Embryonic development and larval stages of *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) - implications for the conservation and rearing of this endangered Neotropical species. *Neotropical Ichthyology*, 10, 313 – 327.

King, L.S., Kozono, D., Agre, P., 2004. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 687–698.

Kujawa, R., Kucharczyk, D., Mamcarz, A., Zarski, D., Targonska, K., 2011. Artificial spawning of common tench *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758), obtained from wild and domestic stocks. *Aquaculture International*, 19, 513–521.

Legendre M., Satyani D., Subandiyah S., Sudarto, Pouyaud L., Baras E., Slembrouck J., 2012. Biology and culture of the clown loach *Chromobotia macracanthus* (Cypriniformes, Cobitidae): 1- Hormonal induced breeding, unusual latency response and egg production in two populations from Sumatra and Borneo Islands. *Aquatic Living Resources*, 25, 95–108.

Leonardo, A. F. G., E. Romagosa, M. I. Borella, S. R. Batlouni. 2004. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus,1766). *Aquaculture*, 240, 451-461.

Lubzens, E., G. Young, J. Bobe & J. Cerdà. 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 367-389.

Madigou, T., Uzbekova, S., Lareyre, J. J., Kah, O., 2002. Two messenger RNA isoforms of the gonadotrophin-releasing hormone receptor, generated by alternative splicing and/or promoter usage, are differentially expressed in rainbowtrout gonads during gametogenesis. *Molecular Reproduction and development*, 63, 151-160.

Mañanos, E., Carrillo, M., Sorbera, L.S., Mylonas, C.C., Asturiano, J.F., Bayarri, M.J., Zohar, Y., Zanuy, S., 2002. Luteinizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue. *Journal Fish Biology*, 60, 328-339.

Mañanós, E.; Ducan, N.; Mylonas, C., 2009. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. In: *Methods in reproductive aquaculture. marine and freshwater species*. E. Cabrita, V. Robles and P. Herra´ez (Eds). CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, p. 509

Marino, G., Panini, E., Longobardi, A., Mandich, A., Finoia, M. G., Zohar, Y., Mylonas, C. C., 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRHa implant *Aquaculture*, 219, 841-858.

Migaud, H., Fontaine, P., Kestemont, P., Wang, N., Brun-Bellut, J., 2004. Influence of photoperiod on the onset of gonadogenesis in Eurasian perch *Perca fluviatilis* *Aquaculture*, 241, 561-574.

Milla, S., Wang, N., Mandiki, S. N. M., Kestemont, P., 2009. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology*, 153, 242-251.

Mousa, M. A., 2010. Induced spawning and embryonic development of *Liza ramada* reared in freshwater ponds. *Animal Reproduction Science*, 119, 115-122.

Mousa, M.A., Mousa, S.A., 2006. Involvement of corticotropin releasing factor and adrenocorticotrophic hormone in the ovarian maturation, seawater acclimation and induced-spawning of *Liza ramada*. *General Comparative Endocrinology*, 146, 167-179.

Mylonas, C. C., A. Fostier, S. Zanuy. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 516-534.

Nagahama, Y. & M. Yamashita. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth & Differentiation*, 50, 195-21.

Nogueira L. B., P. G. Azevedo, M. R. Canelhas, A. G. Bedore, J. M. Lopes, H. P. Godinho. 2012. Induced spawning and early ontogeny in hatchery-reared catfish *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, 10, 89 – 98.

Onuma, T., Ando, H., Koide, N. Okada, H., Urano, A., 2005. Effects of salmon GnRH and sex steroid hormones on expression of genes encoding growth hormone/prolactin/somatolactin family hormones and a pituitary-specific transcription factor in masu salmon pituitary cells in vitro. *General and Comparative Endocrinology*, 143, 129–141.

Patino, R., Sullivan, C.V., 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleosts fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 57–70.

Pham, H. Q., Nguyen, A. T., Nguyen, M. D., Arukwe, A., 2010. Sex steroid levels, oocyte maturation and spawning performance in Waigieu seaperch (*Psammoperca waigiensis*) exposed to thyroxin, human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone releasing hormone and carp pituitary extract. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 155, 223–230.

Romagosa, E., 2010. Reproductive status in females of the Brazilian catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum* reared in cages. *Journal Applied Ichthyology*, 26, 806 – 811.

Rónyai, A., 2007. Induced out-of-season and seasonal tank spawning and stripping of pike perch (*Sander lucioperca* L.). *Aquaculture Research*, 38, 1144-1151.

Schreck, C.B., 2010. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. *General Comparative Endocrinology*, 165, 549–556.

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

Tanaka, H., Kagawa, H., Ohta, H., Unuma, T., Nomura, K., 2003. The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28, 493–497.

Targonska, K & Kucharczyk, D., 2011. The Application of hCG, CPH and Ovopel in Successful Artificial Reproduction of Goldfish (*Carassius auratus auratus*) Under Controlled Conditions. *Reproduction Domestic Animal*, 46, 651–655.

Targonska, K., Müller, T., Krejszeffl, S., Kozłowski, K., Demény, F., Urbányi, B. & Kucharczyk, D., 2012. The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). *Journal Applied Ichthyology*, 28, 873–877.

Trung, D. V. & Bart, A., 2007. Controlled reproduction of an important indigenous fish species, *Spinibarbus denticulatus* (Oshima, 1926), in Southeast Asia, *Aquaculture Research*, 38, 441-451.

Van der Kraak, G., Pankhurst, N.W., Peter, R.E., Lin, H.R., 1989. Lack of antigenicity of human chorionic gonadotropin in silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* and goldfish *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 78, 81–86.

Vazirzadeh, A., Amiri, B. M., Yelghi, S., Hajimoradloo, A., Nematollahi, M. A., Mylonas, C. C., 2011. Comparison of the effects of different methods of mammalian and salmon GnRH α administration on spawning performance in wild-caught female carp (*Cyprinus carpio carpio*) from the Caspian Sea. *Aquaculture*, 320, 123–128.

Von Ihering, R., Azevedo, P., 1936. A desova e a hipofiseação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. *Archivos do Instituto de Biologia*, 7, 107-118.

Woynarovich, E. e Horvath, L., 1989. Propagação artificial de peixes de águas tropicais: Manual de Extensão. Brasília, FAO/CODEVASF/CNPQ. 225p.

Yaron, Z., 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, 129, 49–73.

Zaniboni-Filho, E. & N. D. C. Barbosa, 1996. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. *Revista Brasileira de Biologia*, 56, 655-659.

Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th edn. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. pp. 662.

Żarski, D., Krejszeff, S., Horváth, A., Bokor, Z., Palińska, K., Szentes, K., Łuczyńska, J., Targońska, K., Kupren, K., Urbányi, B., Kucharczyk, D., 2012. Dynamics of composition and morphology in oocytes of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during induced spawning. *Aquaculture*, 364–365, 103–110.

Żarski, D., Palińska, K., Targońska, K., Bokor, Z., Kotrik, L., Krejszeff, S., Kupren, K., Horvath, A., Urbanyi, B., Kucharczyk, D., 2011b. Oocyte quality indicators in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during reproduction under controlled conditions. *Aquaculture*, 313, 84–91.

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

Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General Comparative Endocrinology*, 165, 438–455.

TABELAS:

Tabela 1: Valores percentuais médios (\pm erro padrão) do desempenho reprodutivo de fêmeas de *L. macrocephalus* submetidas à indução hormonal.

	TRATAMENTOS			
	EBHC	mGnRHa – L	mGnRHa – S	hCG
Nº fêmeas injetadas	8	8	8	5
Período latência (h)	19,34 \pm 0,40 ^a	12,00 \pm 1,73 ^b	10,50 \pm 0,01 ^b	-
Percentual desova (%)	71,43 \pm 18,44 ^a	100,00 \pm 0,00 ^a	100,00 \pm 0,00 ^a	0 ^b
Fertilidade (%)	63,57 \pm 16,45 ^a	6,25 \pm 2,46 ^b	93,75 \pm 2,95 ^a	-
Eclosão (%)	59,07 \pm 15,25 ^a	0 ^b	89,15 \pm 1,72 ^a	-
Fecundidade absoluta (x10⁴)	99,64 \pm 13,91 ^a	102,95 \pm 11,55 ^a	61,45 \pm 11,45 ^a	-
IGS	12,07 \pm 2,12 ^a	13,34 \pm 0,78 ^a	15,73 \pm 2,72 ^a	20,18 \pm 4,08 ^a

EBHC: extrato bruto de hipófise de carpa; mGnRHa – L: hormônio liberador de gonadotrofinas na forma líquida; mGnRHa – S: hormônio liberador de gonadotrofinas na forma sólida e hCG: gonadotrofina coriônica humana. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Tabela 2. Valores percentuais médios (\pm erro padrão) das frequências dos distintos tipos de ovócitos (núcleo central, excêntrico ou sem núcleo) coletados por canulação antes da indução hormonal (n = 8).

TRATAMENTOS	TIPOS DE OVÓCITOS		
	Núcleo central (%)	Núcleo excêntrico (%)	Sem núcleo (%)
EBHC	37,39 \pm 6,31	38,19 \pm 4,94	24,36 \pm 5,42
mGnRH – L	45,45 \pm 5,13	39,65 \pm 5,65	14,92 \pm 1,99
mGnRH – S	31,45 \pm 4,46	53,38 \pm 5,93	15,17 \pm 2,01
hCG	43,20 \pm 5,06	40,80 \pm 4,98	16,02 \pm 1,89

EBHC: extrato bruto de hipófise de carpa; mGnRHa – L: hormônio liberador de gonadotrofinas na forma líquida; mGnRHa – S: hormônio liberador de gonadotrofinas na forma sólida e hCG: gonadotrofina coriônica humana.

Tabela 3: Descrição histológica dos diferentes tipos de ovócitos em fêmeas de *L. macrocephalus* submetidas à indução hormonal.

Classificação dos Ovócitos	Descrição Histológica
Pré-vitelogênico (PV)	O núcleo é grande, posicionado centralmente com numerosos nucléolos, o citoplasma é intensamente basófilo em decorrência de um intenso acúmulo de RNA.
Alvéolo cortical (AC)	Apresenta alvéolos citoplasmáticos corticais, núcleo pouco corado contendo nucléolos periféricos basófilos e o acúmulo inicial de lipídio.
Vitelogênico imaturo (VI)	Ovócitos que não apresentam vitelogênese completa, ou seja, o citoplasma ainda não está preenchido totalmente por vitelo.
Vitelogênico maduro com núcleo central (VNC)	Nesta fase o ovócito aumenta de tamanho devido ao aumento do número de grânulos de vitelo e o núcleo é central.
Vitelogênico maduro com núcleo migrado (VNM)	O ovócito continua grande devido ao aumento do número de grânulos de vitelo, porém o núcleo inicia a migração em direção à região da micrópila.
Vitelogênico maduro com quebra da vesícula germinativa (GVBD)	Durante esta fase numerosos grânulos de vitelo ainda ocupam o ovócito e observa-se o rompimento do envelope nuclear (quebra da vesícula germinativa).
Folículo pós-ovulatório (FPO)	Apresentam estruturas distorcidas e células foliculares que sofrem hipertrofia.
Atrésico (AT)	Apresenta alterações na aparência do citoplasma, desintegração da vesícula germinal e fragmentação da zona radiata.

Tabela 4: Valores médios da concentração plasmática (\pm erro padrão) do estradiol (E_2) em diferentes períodos durante a indução hormonal ($n = 8$ por tratamento).

TRATAMENTOS	PERÍODO		
	Antes da 1 ^o dose (pg mL ⁻¹)	Antes da 2 ^o dose (pg mL ⁻¹)	Após ovulação (pg mL ⁻¹)
EBHC	266,38 \pm 26,03 ^{aB}	344,30 \pm 82,31 ^{bB}	623,40 \pm 135,22 ^{aA}
mGnRH – L	249,03 \pm 30,35 ^{aB}	-	429,46 \pm 77,72 ^{bA}
mGnRH – S	230,71 \pm 30,37 ^{aB}	-	716,57 \pm 84,77 ^{aA}
hCG	201,49 \pm 11,47 ^{aB}	682,24 \pm 208,34 ^{aA}	571,68 \pm 84,66 ^{aA}

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos em cada período e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre o mesmo tratamento em diferentes períodos ($p < 0,05$). EBHC: extrato bruto de hipófise de carpa; mGnRH – L: hormônio liberador de gonadotrofinas na forma líquida; mGnRH – S: hormônio liberador de gonadotrofinas na forma sólida e hCG: gonadotrofina coriônica humana.

Tabela 5: Valores médios da concentração plasmática (\pm erro padrão) da 17α – hidroxiprogesterona (17α – OHP) em diferentes períodos durante a indução hormonal (n = 8 por tratamento).

TRATAMENTOS	PERÍODO		
	Antes da 1ª dose (pg mL ⁻¹)	Antes da 2ª dose (pg mL ⁻¹)	Após ovulação (pg mL ⁻¹)
EBHC	51,37 \pm 5,99 ^{aB}	52,87 \pm 5,22 ^{bB}	110,85 \pm 15,82 ^{aA}
mGnRH – L	59,00 \pm 4,05 ^{aB}	-	88,25 \pm 4,37 ^{bA}
mGnRH – S	39,97 \pm 12,76 ^{aA}	-	50,75 \pm 2,26 ^{bA}
hCG	48,37 \pm 3,36 ^{aB}	80,05 \pm 9,81 ^{aA}	54,02 \pm 12,39 ^{bB}

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos em cada período e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre o mesmo tratamento em diferentes períodos ($p < 0,05$). EBHC: extrato bruto de hipófise de carpa; mGnRHa – L: hormônio liberador de gonadotrofinas na forma líquida; mGnRHa – S: hormônio liberador de gonadotrofinas na forma sólida e hCG: gonadotrofina coriônica humana.

FIGURAS:

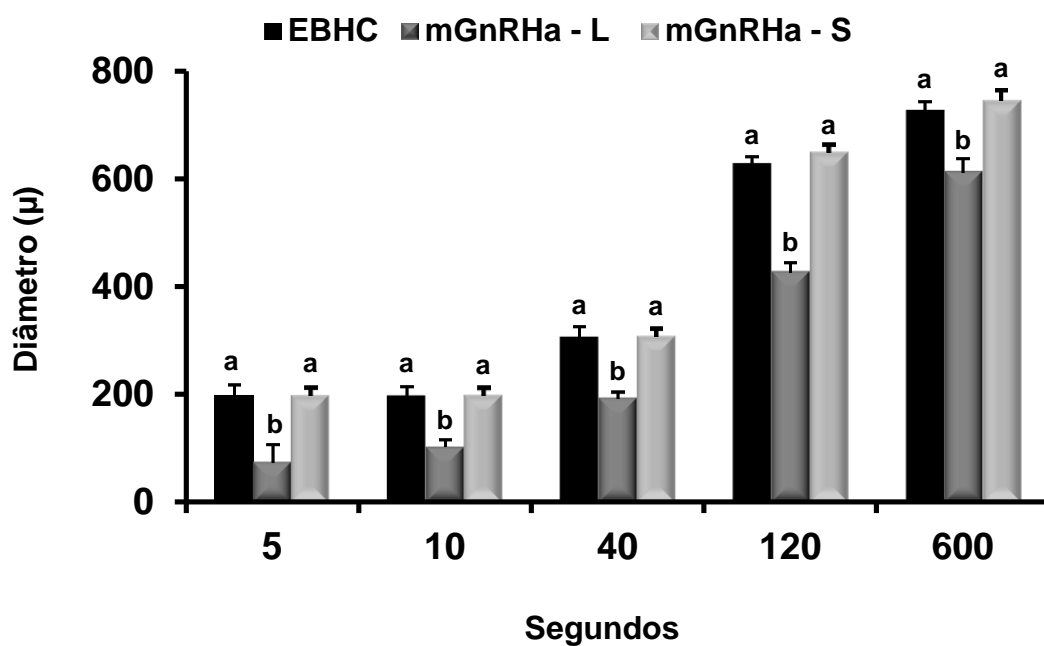


Figura 1. Valores percentuais médios (\pm erro padrão) do diâmetro dos ovócitos coletados durante o processo de hidratação em diferentes períodos após a fecundação (n = 4). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). EBHC: extrato bruto de hipófise de carpa; mGnRHa - L: hormônio liberador de gonadotrofinas na forma líquida e mGnRHa - S: hormônio liberador de gonadotrofinas na forma sólida.

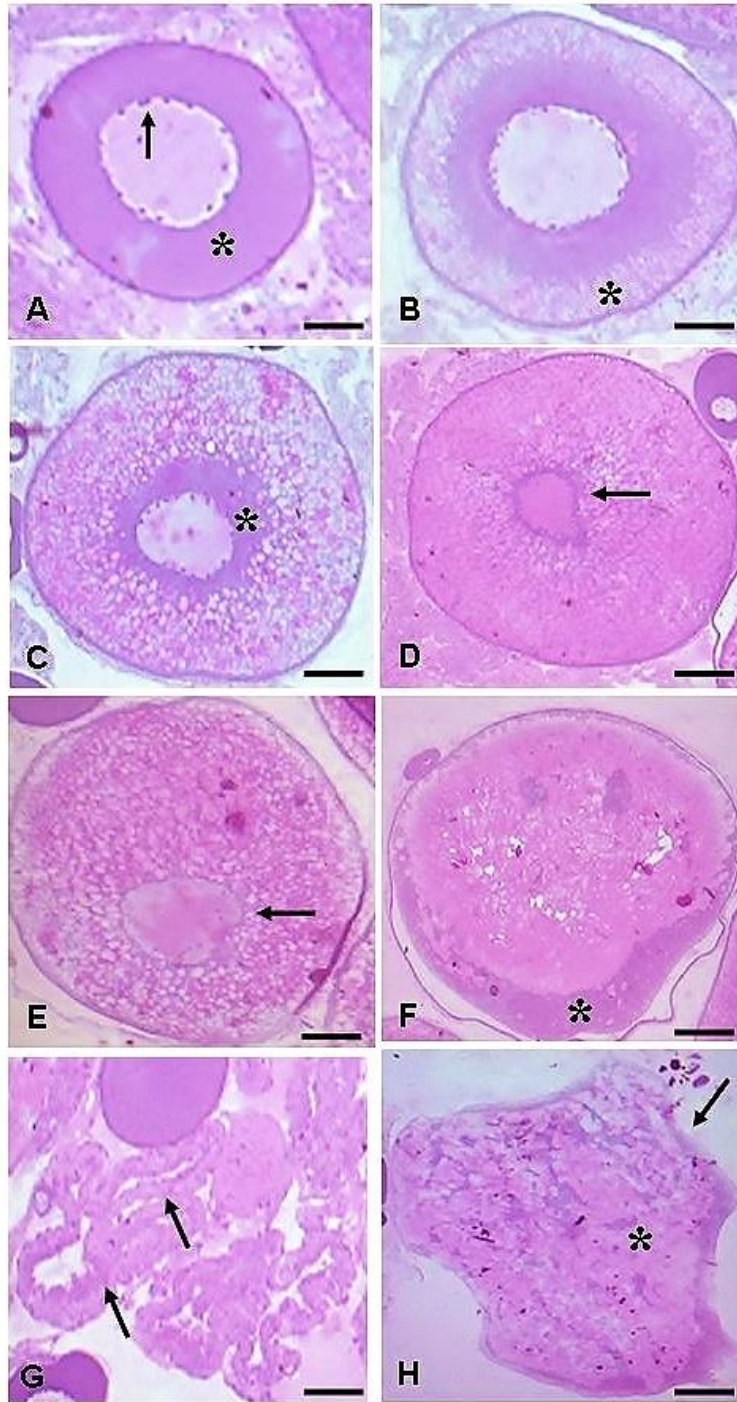


Figura 2. Fotomicrografias de seções histológicas de ovário de *L. macrocephalus* submetidos à indução hormonal. (A) ovócito pré-vitelogênico com citoplasma intensamente basófilo (asterisco) e diversos nucléolos (seta); (B) ovócito alvéolo-cortical com a presença de vesículas citoplasmáticas (asterisco); (C) ovócito vitelogênico imaturo com citoplasma ainda não preenchido totalmente por vitelo (asterisco); (D) ovócito vitelogênico núcleo central com núcleo na posição central (seta); (E) ovócito vitelogênico núcleo migrado apresentando núcleo deslocado (seta); (F) ovócito vitelogênico maduro com quebra da vesícula germinativa apresentando ruptura do envelope nuclear (asterisco); (G) folículos pós-ovulatórios (setas); (H) ovócitos atrésico com fragmentação da zona radiata (seta) e mudança na aparência do citoplasma (asterisco). Barras: 10 μ m. Coloração Hematoxilina-Floxina.

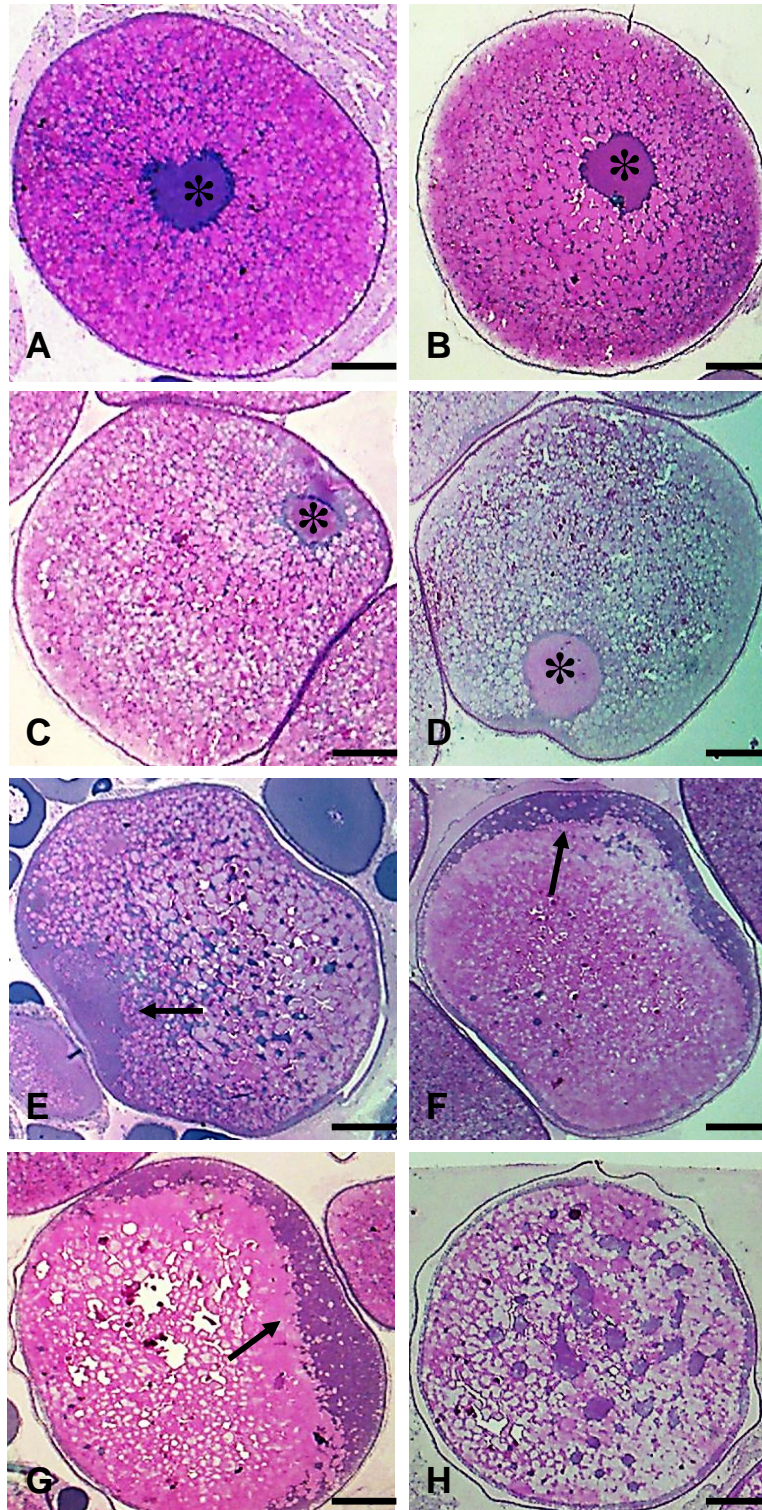


Figura 3. Fotomicrografias de secções histológicas de ovário de *L. macrocephalus* submetidos à indução hormonal. (A) ovócito apresentando núcleo na posição central (asterisco); (B) ovócito iniciando a migração do núcleo (asterisco); (C) ovócito apresentando núcleo parcialmente deslocado para a periferia do ovócito (asterisco); (D) ovócito com núcleo totalmente migrado para a periferia do ovócito (asterisco); (E) ovócito apresentando ruptura inicial do envelope nuclear (seta); (F) ovócito com ruptura do envelope nuclear e liberação inicial do material nuclear (seta); (G) ovócito com ruptura do envelope nuclear e liberação do material nuclear (seta); (H) ovócito ovulado. Barras: 10 μ m.

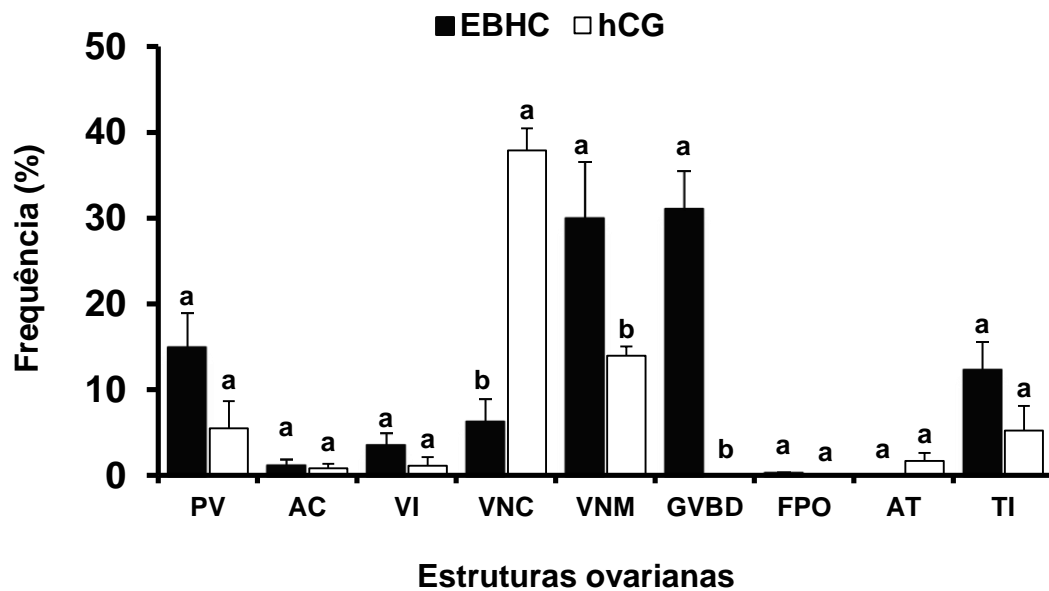


Figura 4. Valores médios (\pm erro padrão) da frequência percentual de diferentes tipos de ovócitos em ovários coletados antes da segunda dose hormonal ($n = 4$ por tratamento). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). Ovócitos: PV (pré-vitelogênico); AC (alvéolo cortical); VI (vitelogênico imaturo); VNC (vitelogênico núcleo central); VNM (vitelogênico núcleo migrado); GVBD (vitelogênico maduro com quebra da vesícula germinativa); FPO (folículo pós-ovulatório) e AT (atrésico). EBHC: extrato bruto de hipófise de carpa e hCG: gonadotrofina coriônica humana.

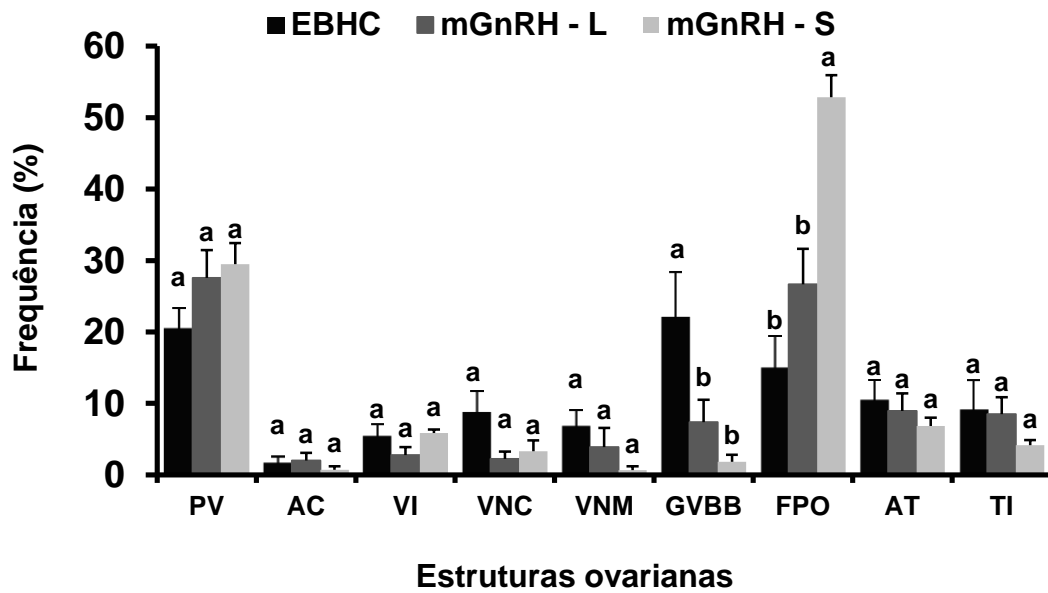


Figura 5. Valores médios (\pm erro padrão) da frequência percentual de diferentes tipos de ovócitos em ovários coletados após a ovulação ($n = 4$ por tratamento). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). Ovócitos: PV (pré-vitelogênico); AC (alvéolo cortical); VI (vitelogênico imaturo); VNC (vitelogênico núcleo central); VNM (vitelogênico núcleo migrado); GVBD (vitelogênico maduro com quebra da vesícula germinativa); FPO (folículo pós-ovulatório) e AT (atrésico). EBHC: extrato bruto de hipófise de carpa; mGnRH_a - L: hormônio liberador de gonadotrofinas na forma líquida e mGnRH_a - S: hormônio liberador de gonadotrofinas na forma sólida.