

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**NÍVEIS DE PGF<sub>2α</sub> E ESTEROIDES GONADAIS  
DURANTE A HIPOFISAÇÃO DE *Piaractus*  
*mesopotamicus* COM OU SEM USO DE PGF<sub>2α</sub>  
EXÓGENA.**

**Rafael Tomoda Sato**

Jaboticabal, São Paulo  
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**NÍVEIS DE PGF<sub>2α</sub> E ESTEROIDES GONADAIS  
DURANTE A HIPOFISAÇÃO DE *Piaractus*  
*mesopotamicus* COM OU SEM USO DE PGF<sub>2α</sub>  
EXÓGENA.**

**RAFAEL TOMODA SATO**

**ORIENTADOR: DR. SERGIO RICARDO BATLOUNI**

**COORIENTADOR: DR. RAFAEL YUTAKA KURADOMI**

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

Jaboticabal, São Paulo  
2018

Sato, Rafael Tomoda  
S253n Níveis de PGF<sub>2α</sub> e esteroides gonadais durante a hipofiseção de  
*Piaractus mesopotamicus* com ou sem uso de PGF<sub>2α</sub> exógena / Rafael  
Tomoda Sato. – – Jaboticabal, 2018  
ii, 33 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de  
Aquicultura, 2018  
Orientador: Sergio Ricardo Batlouni  
Coorientador: Rafael Yutaka Kuradomi  
Banca examinadora: Fábio Rosa Sussel, Laura Satiko Okada  
Nakaghi  
Bibliografia

1. Hipofiseção. 2. Desova total. 3. Prostaglandina. 4. Hormônios  
reprodutivos, ELISA. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3

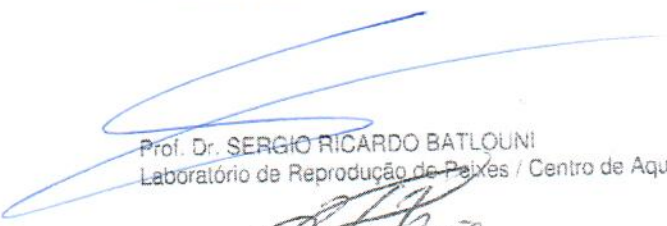
Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

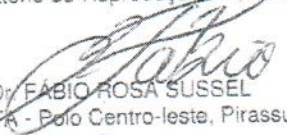
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** NÍVEIS DE PGF2 E ESTERÓIDES GONADAIS DURANTE A HIPOFISAÇÃO  
de *Piaractus mesopotamicus* COM OU SEM USO DE PGF2 EXÓGENA

**AUTOR:** RAFAEL TOMODA SATO  
**ORIENTADOR:** SERGIO RICARDO BATLOUNI  
**COORDENADOR:** RAFAEL YUTAKA KURADOMI

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

  
Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI  
Laboratório de Reprodução de Peixes / Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP

  
Prof. Dr. FÁBIO ROSA SUSSE  
/ APTA - Polo Centro-leste, Pirassununga, SP

  
Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 28 de fevereiro de 2018

*“Pra tudo tem um jeito, e se  
não teve jeito ainda não  
chegou ao fim.”*

*“Quem não escuta cuidado,  
escuta coitado, pode acreditar.”*

## *Dedico*

*Aos meus pais Edison e Luiza,  
aos meus irmãos Rodrigo e Fabrício,  
à minha namorada Marina,  
e ao meu filho Lucas.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre estar do meu lado e por me mostrar o caminho correto a seguir nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni, pela oportunidade, pela confiança, pelos conselhos e ensinamentos tanto na parte profissional quanto na parte pessoal.

Ao meu co-orientador, o agora Prof. Dr. Rafael Yutaka Kuradomi (Jack), por todos os ensinamentos, broncas e conselhos, mas principalmente pela amizade.

Aos membros da banca examinadora da minha qualificação, Dra. Maria do Carmo Faria Paes e Dra. Fernanda Nogueira Valentin, pelas sugestões e correções que ajudaram a melhorar este estudo.

Aos membros da banca examinadora de defesa, Dr. Fábio Rosa Sussel e Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, pelas contribuições e sugestões para a dissertação.

A minha família, pais e irmãos, pelo apoio, compreensão e carinho, neste período que não foi fácil, não seria nada sem vocês.

A Marina, por estar junto comigo nesta jornada, pela ajuda tanto no trabalho quanto na vida pessoal. Você é muito especial para mim, com certeza não teria conseguido sem você.

Ao meu filho Lucas, que mesmo sendo ainda um bebê, me faz ser uma pessoa melhor, tendo mais garra e fibra para alcançar meus objetivos.

À família da Marina, em especial a Márcia, pela ajuda e pelo carinho em todos os momentos.

Ao grupo de reprodução de peixes nativos, Marina, Jack, Muringa, Xina, Mari, Laíza, Tex e Milene, pela ajuda nos experimentos e análises e pela amizade.

Aos amigos da república Amoribunda, Buda, Kbanha, Kúkida, Covi, Uatarréu e Fernandinho pela convivência, aprendizado, churrascos/cevejas e principalmente pela amizade e lealdade.

Aos funcionários Valdecir, Márcio, Luís, Silvinha e David, pela grande ajuda, ensinamentos e amizade.

A todas as pessoas que torceram para meu sucesso.

Muito Obrigado!

## Sumário

|                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>AGRADECIMENTOS .....</b>                                                                            | <b>1</b>  |
| <b>APOIO FINANCEIRO .....</b>                                                                          | <b>4</b>  |
| <b>RESUMO .....</b>                                                                                    | <b>5</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                  | <b>6</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                             | <b>7</b>  |
| <b>2. OBJETIVO .....</b>                                                                               | <b>11</b> |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                     | <b>11</b> |
| <b>3.1. Local, animais e condição de manejo .....</b>                                                  | <b>11</b> |
| <b>3.2. Amostras de plasma.....</b>                                                                    | <b>13</b> |
| <b>3.3. Amostra de ovócitos .....</b>                                                                  | <b>14</b> |
| <b>3.4. Desempenho reprodutivo .....</b>                                                               | <b>15</b> |
| <b>3.5. Análise estatística.....</b>                                                                   | <b>16</b> |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>                                                                             | <b>17</b> |
| <b>4.1. Comparação entre os percentuais dos diferentes tipos de ovócitos entre os tratamentos.....</b> | <b>17</b> |
| <b>4.2. Comparação entre os níveis plasmáticos dos hormônios entre os tratamentos.....</b>             | <b>18</b> |
| <b>4.3. Comparação dos níveis plasmáticos hormonais por tratamento ao longo do tempo.....</b>          | <b>20</b> |
| <b>4.4. Desempenho reprodutivo .....</b>                                                               | <b>21</b> |
| <b>4.5. Características seminais.....</b>                                                              | <b>21</b> |
| <b>5. DISCUSSÃO .....</b>                                                                              | <b>24</b> |
| <b>6. CONCLUSÕES .....</b>                                                                             | <b>27</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                              | <b>28</b> |



## **APOIO FINANCEIRO**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (processos nº 458274/2014-3 e 447169/2014-9, “Programa de Apoio aos Biotérios da Unesp” – PROPE-UNESP-2014 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo nº 16/20741-3) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

## RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi determinar as concentrações plasmáticas de  $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-one (DHP), Estradiol  $17\beta$  ( $E_2$ ), Testosterona (T) e Prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) e a distribuição percentual dos diferentes tipos de ovócitos presentes nos ovários ao longo do processo de hipofisação de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com ou sem uso de PGF exógena. Para isto, 23 fêmeas foram distribuídas em cinco tratamentos, com indução dividida em duas doses com intervalo de 24 horas: (0,2 mL.kg<sup>-1</sup> solução salina) + (0,2 mL.kg<sup>-1</sup> solução salina) (T1); (0,2 mL.kg<sup>-1</sup> solução salina) + (0,2 mL.kg<sup>-1</sup> solução salina e 2 ml  $PGF_{2\alpha}$ ) (T2); (0,6 mg.kg<sup>-1</sup> EBHC (extrato bruto de hipófise de carpa)) + (0,2 mL.kg<sup>-1</sup> solução salina e 2 mL  $PGF_{2\alpha}$ ) (T3); (0,6 mg.kg<sup>-1</sup> EBHC) + (5,4 mg.kg<sup>-1</sup> EBHC) (T4); (0,6 mg.kg<sup>-1</sup> EBHC) + (5,4 mg.kg<sup>-1</sup> EBHC e 2 mL  $PGF_{2\alpha}$ ) (T5). Foram coletadas amostras de sangue e ovócitos para análise dos níveis plasmáticos de  $PGF_{2\alpha}$ , DHP,  $E_2$  e T e avaliação dos tipos de ovócitos em quatro períodos após a segunda dose. O uso de  $PGF_{2\alpha}$  exógena provocou um pico plasmático de  $PGF_{2\alpha}$  uma hora após a segunda dose hormonal. A hipofisação, com ou sem o uso de  $PGF_{2\alpha}$  exógena, provocou pico plasmático de  $PGF_{2\alpha}$  no momento da desova. O uso de  $PGF_{2\alpha}$  exógena juntamente hipofisação (T5) eleva a taxa de ovulação de pacu em relação a fêmeas apenas hipofisadas (T4), provavelmente em função de níveis de GVBD e de  $PGF_{2\alpha}$  superiores de T5, quatro horas após a segunda dose hormonal.

**PALAVRAS-CHAVE:** hipofisação, desova total, prostaglandina, hormônios reprodutivos, ELISA.

## ABSTRACT

The main objective of this study was to determine the plasma concentrations of  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP),  $17\beta$ -Estradiol ( $E_2$ ), Testosterone (T) and Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) and the different types of oocytes present in the ovaries throughout the pacu (*Piaractus mesopotamicus*) hypophysation process with or without the use of exogenous  $PGF_{2\alpha}$ . To that, 23 females were distributed in five treatments, with induction divided into two doses with a 24-hour interval: (0.2 mL.kg<sup>-1</sup> saline) + (0.2 mL.kg<sup>-1</sup> saline) (T1); (0.2 mL.kg<sup>-1</sup> saline) + (0.2 mL.kg<sup>-1</sup> saline and 2 mL  $PGF_{2\alpha}$ ) (T2); (0.6 mg.kg<sup>-1</sup> CPE (crude pituitary extract)) + (0.2 mL.kg<sup>-1</sup> saline and 2 mL  $PGF_{2\alpha}$ ) (T3); (0.6 mg.kg<sup>-1</sup> CPE) + (5.4 mg.kg<sup>-1</sup> CPE) (T4); (0.6 mg.kg<sup>-1</sup> CPE) + (5.4 mg.kg<sup>-1</sup> CPE and 2 mL  $PGF_{2\alpha}$ ) (T5). Blood and oocyte samples were collected for analysis of plasma levels of  $PGF_{2\alpha}$ , DHP,  $E_2$  and T in four periods after the second dose. The use of exogenous  $PGF_{2\alpha}$  caused a plasma peak of  $PGF_{2\alpha}$  one hour after the second hormonal dose. Hypophysation, with or without the use of exogenous  $PGF_{2\alpha}$ , caused a plasma peak of  $PGF_{2\alpha}$  at the time of spawning. The use of exogenous  $PGF_{2\alpha}$  together with hypophysation (T5) increased the pacu ovulation rate in relation to hypophysation only (T4), probably as a result of higher GVBD and  $PGF_{2\alpha}$  levels of T5, four hours after the second hormonal dose.

**KEYWORDS:** hypophysation, total spawning, prostaglandin, reproductive hormones, ELISA

## 1. INTRODUÇÃO

A produção total da piscicultura no Brasil em 2015 (483,24 mil toneladas) apresentou aumento de 1,5% em relação ao ano anterior e de acordo com estimativas atuais (ainda não publicadas) continua em ascensão principalmente em função da tilapicultura, a qual cresceu 9,7% em 2015, correspondendo à 45,4% da piscicultura nacional (IBGE, 2016). Neste cenário atual, destacamos que a tilápia (como também as três espécies de peixe mais produzidas no Brasil: tambaqui, tambacu e carpa), apresenta um pacote tecnológico para produção já relativamente bem desenvolvido (ao longo de décadas). Observa-se, para estas quatro espécies supracitadas que lideram a produção continental nacional, a relativa facilidade e previsibilidade para a produção de alevinos em cativeiro (IBGE 2014 e 2015).

Logo abaixo das espécies mais produzidas (supracitadas) no ranking nacional de produção (IBGE, 2016), figuram diversas espécies nativas (predominantemente as migradoras de médio e grande porte), entre as quais encontramos o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), objeto de estudo deste trabalho. O pacu é atualmente a sexta espécie de peixe mais cultivada do Brasil, representa 2,7% da produção brasileira de peixes (IBGE, 2016) e é considerado de grande importância comercial devido às suas características zootécnicas como rusticidade e rápido crescimento em diversas condições de cultivo. Trata-se de um caracídeo neotropical, onívoro e de desova total (Urbinati et al., 2010) cujo período reprodutivo vai de outubro a março. O período mais intenso para a reprodução induzida em cativeiro vai de novembro a janeiro, quando as temperaturas são mais altas e há maiores índices pluviométricos, porém, variações neste intervalo são amplamente reportadas entre regiões e entre diversos empreendimentos aquícolas (Urbinati et al., 2010).

Como a vasta maioria dos peixes migradores nativos, esta espécie apesar de apresentar maturação gonadal completa em cativeiro, precisa ser hormonalmente induzida para alcançar sua reprodução (Zaniboni-Filho & Weingart, 2007; Mylonas et al., 2010). Esta técnica consiste na aplicação de hormônios como o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), o inibidor de dopamina (domperidona) e a gonadotropina coriônica humana (hCG), mas a mais comumente usada é a

hipofiseação, que consiste no uso de extrato bruto de hipófises de peixes maduros (EBH) (Andrade & Yasui, 2003).

Sabe-se que o EBH utilizado na hipofiseação contém o hormônio luteinizante (LH), o qual possui receptores nos ovários que quando ativados desencadeiam uma cascata de eventos (mediados por esteroides gonadais) que culmina na maturação final (retomada da meiose, condensação cromossômica e migração e quebra da vesícula germinativa (GVBD)) e ovulação (Nagahama & Yamashita, 2008; Almeida, 2013). Durante este processo destaca-se a respectiva redução e aumento dos níveis plasmáticos de estradiol  $17\beta$  ( $E_2$ ) e  $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-one (DHP) que precedem a ovulação (Levavi-Zermonsky & Yaron, 1986; Mylonas et al., 2010). O DHP é sintetizado a partir da conversão do esteroide  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona ( $17\alpha$ -OHP) por meio da enzima  $20\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase ( $20\beta$ -HSD), cuja síntese e secreção é controlada pelo LH (Nagahama & Yamashita, 2008). Desta forma, assume-se que o LH presente no EBH é a principal substância responsável pela maturação final e ovulação no processo de hipofiseação (Mylonas et al., 2010; Aizen et al., 2012). A ovulação e desova ocorrem quando os ovócitos maduros são liberados do folículo ovariano através do rompimento das conexões entre células da granulosa e ovócitos. A desova ocorre quando os ovócitos ovulados são liberados para parte externa do animal através da papila urogenital, processo este impulsionado por contrações da musculatura lisa da parede folicular (Goetz, 1983).

A desova do pacu, em cativeiro, só ocorre mediante indução hormonal, sendo o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) o mais utilizado. No entanto, independentemente do protocolo empregado, a reprodução de pacu em cativeiro apresenta falhas na ovulação, a qual é uma das principais limitações para sua produção (Criscuolo-Urbinati et al., 2012). Neste cenário, destacamos também que, tanto para a produção de híbridos (tambacu e patinga) como do próprio pacu, o domínio da reprodução desta espécie é necessário e imperativo, pois a falha na ovulação das fêmeas injetadas leva à morte das matrizes inviabilizando a manutenção de um plantel apropriado e, também, a programas de melhoramento genético. Portanto, o desenvolvimento de protocolos seguros para a desova desta espécie é imperativo para a exploração de todo potencial da mesma, para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético e, até mesmo, para a

disponibilização de matrizes para a produção de híbridos de forma organizada e controlada (Hashimoto et al., 2015).

O uso de EBHC ainda é o meio mais eficaz e comum de produzir alevinos de espécies nativas (Caneppele et al., 2015; De Souza et al., 2015; Ittzés et al., 2015; Viveiros et al., 2015; Boscolo-Pereira et al., 2017), no entanto, o principal problema relacionado é a imprevisibilidade na ovulação (Mylonas et al., 2010; Criscuolo-Urbinati et al., 2012; Hainfellner et al., 2012; Boscolo-Pereira et al., 2017). Por esta e outras razões, em diversas outras espécies, o uso da hipofiseção vem sendo gradativamente substituído por produtos sintéticos (Drori et al., 1994; Mylonas et al., 2010; Targonska & Kucharczyk, 2011; Ittzés et al., 2015; Podhorec et al., 2016). Todavia, o uso destes produtos sintéticos, principalmente o GnRH, não se mostraram totalmente eficazes nas espécies nativas, pois normalmente, apesar das fêmeas ovularem, os embriões obtidos morrem antes da eclosão dos ovos (Acuña & Rangel, 2009; Paulino et al., 2011; Boscolo-Pereira et al., 2017). Por esta razão, devemos considerar, a curto e médio prazo, a necessidade da continuidade e aprimoramento do uso do EBHC para a produção de espécies nativas, pois a produção nacional aquícola de espécies nativas é praticamente toda embasada no uso desta técnica.

Assim, conhecendo o potencial das prostaglandinas (PGs) para induzir a ovulação, em 2012 iniciamos uma série de tentativas para otimizar a ovulação do pacu com uso de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) exógena concomitante com a hipofiseção. Havíamos identificado inicialmente em ovários de matrinxã (Hainfellner et al., 2012) e pacu (Criscuolo-Urbinati et al., 2012), induzidos à desova com EBHC, mas que não ovularam, um percentual expressivo de ovócitos GVBD que permaneceram retidos nos ovários. Estes dados mostraram claramente que nestas fêmeas o uso de EBHC foi capaz de promover a GVBD (maturação final), mas não a ovulação. De posse destas informações, propusemos um novo protocolo, incluindo a administração do análogo de  $PGF_{2\alpha}$  (2 mL de Ciosin® por peixe contendo  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  de cloprostenol), juntamente com a hipofiseção convencional ( $0,6$  e  $5,4 \text{ mg.kg}^{-1}$  com um intervalo de 24 horas entre as doses). A dose de  $PGF_{2\alpha}$  foi aplicada no momento da segunda dose de EBHC e causou aumento significativo na taxa de ovulação de *P. mesopotamicus* com consequente aumento da frequência folículos pós-ovulatórios (Criscuolo-Urbinati et al., 2012).

No entanto, mesmo com os resultados positivos com o uso concomitante de EBHC e  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Criscuolo-Urbinati et al., 2012), observamos que, eventualmente, algumas fêmeas submetidas a este protocolo apresentavam um alto valor de unidade térmica acumulada (UTA), ou seja, levavam um tempo maior entre a segunda dose hormonal e a ovulação, nas quais a dificuldade de liberar os ovócitos mediante extrusão persistia. Após a fertilização, os ovócitos destas fêmeas apresentavam taxas inferiores de fertilidade e eclosão quando comparadas as fêmeas que desovam com um valor de UTA menor entre a segunda dose hormonal e a ovulação. Estas observações nos levaram a checar se o protocolo com uso de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  poderia ser modificado para intensificar ainda mais o processo de ovulação do pacu. Assim, aventamos a hipótese de que se conseguíssemos provocar um pico de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  endógena no momento da ovulação por meio da administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena, teoricamente poderíamos intensificar a ovulação desta espécie. Ou seja, surgiu a necessidade de avaliar se o momento estabelecido para aplicação da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena (segunda dose hormonal) era adequado para intensificar a ovulação.

Tem sido demonstrado que as PGs são substâncias eficientes na indução da ovulação em vários teleósteos (Fujimori et al., 2011 e 2012; Takahashi et al., 2013; Knight & Van der Kraak, 2015). As PGs são eicosanoides produzidos a partir do ácido araquidônico (AA) em uma cascata enzimática que inclui uma enzima chave, conhecida como ciclooxigenase-2 (Cox-2) (Fujimori et al., 2011 e 2012; Takahashi et al., 2013). Sabe-se que folículos maduros in vitro tratados com DHP aumentaram a produção das prostaglandinas  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) e  $\text{PGF}_{2\alpha}$  de forma dose-dependente durante a ovulação (Berndston et al., 1989; Bradley & Goetz, 1994; Kagawa et al., 2003). Portanto, a síntese e ação das PGs sobre a ovulação sofre interferência e interfere com a síntese e liberação de esteroides gonadais, especialmente com o DHP (Knight & Van der Kraak, 2015). Assim, devido a relação entre PGs e DHP no processo de ovulação em teleósteos, o estudo concomitante destas substâncias é imprescindível para o desenvolvimento de conhecimento sobre a ovulação bem-sucedida neste grupo.

Outros esteroides gonadais também apresentam associação com a ovulação em peixes. Foi demonstrado que a testosterona (T) apresenta pico de concentração plasmática durante a maturação final em *Oncorhynchus kisutch* (Fitzpatrick et al.,

1986) e em *Pleuronectes americanus* (Truscott et al., 1992) ou próximo à ovulação em *Stizostedion vitreum* (Malison et al., 1994), em *Oncorhynchus tshawytscha* (Slater et al., 1994) e em *Salmo trutta* (Hoogenboom et al., 2012). Além disso, sabe-se que o E<sub>2</sub> apresenta diminuição em seus níveis apenas momentos antes da ovulação (Levavi-Zermonsky & Yaron 1986; Asturiano et al. 2002; Lubzens et al. 2010) e que houve uma inibição da produção de hormônios indutores de maturação (MIH) dos folículos quando expostos ao tratamento com E<sub>2</sub> in vitro (Jalabert & Fostier 1984 Pang et al. 2008; Pang & Thomas 2010).

## 2. OBJETIVO

O principal objetivo deste trabalho foi determinar as concentrações plasmáticas de DHP, E<sub>2</sub>, T e PGF<sub>2α</sub> e a distribuição percentual dos diferentes tipos de ovócitos presentes nos ovários ao longo do processo de hipofiseação com ou sem uso de PGF exógena (Ciosin®).

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Local, animais e condição de manejo

Os trabalhos foram realizados no Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), Jaboticabal, SP no biotério de Reprodução de Peixes Nativos. Neste estudo, fêmeas adultas de pacu, com quatro anos de idade e massa média de 3103,48 ± 792,42 g, foram mantidas em viveiros escavados de 200m<sup>2</sup> (em uma densidade de 0,80 kg.m<sup>-2</sup>) abastecidos com vazão constante de aproximadamente 20 L.min<sup>-1</sup>. Durante o ano, exceto no período de indução hormonal, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia até a saciedade aparente (aproximadamente 1-4% da biomassa) com ração comercial Onívoros Crescimento - Fri-Acqua, contendo 28% de proteína bruta, 3,5% extrato etéreo, 12% cinzas e 9% de matéria fibrosa, de acordo com informações do fabricante sobre o lote. Os peixes utilizados foram produzidos no CAUNESP a partir de cruzamentos realizados com o plantel de matrizes e reprodutores da Instituição. Os animais foram mantidos e utilizados de



acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP- Campus de Jaboticabal-SP (Protocolo nº 003837/17).

Os parâmetros físicos e químicos da água foram determinados quinzenalmente por volta das sete horas da manhã durante o ano nos viveiros onde os peixes foram mantidos. A temperatura e a condutividade foram aferidas por meio de uma sonda HANNA, HI-98311, o pH foi aferido por meio de uma sonda KASVI, K39-0014P e o oxigênio dissolvido com uma sonda BERNAUER-424 AQUACULTURA, F-1550A. Os valores anuais médios destes parâmetros para temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade foram respectivamente  $22,50 \pm 2,70$  °C;  $5,71 \pm 0,88$ ;  $6,43 \pm 0,13$  mg.L<sup>-1</sup>; e  $34,45 \pm 10,60$  µS.cm<sup>-1</sup>. Durante as desovas os peixes foram mantidos em sistema de recirculação fechado com água mantida a temperatura constante de  $26,70 \pm 0,40$  °C.

A seleção das fêmeas aptas foi feita inicialmente a partir de características externas como ventre abaulado e presença de papila hemorrágica (Kuradomi et al., 2017; Schorer et al., 2016) e posteriormente, foram separadas apenas as fêmeas que apresentaram frequência  $\geq 30\%$  de ovócitos com núcleo excêntrico (Romagosa et al., 1990), sendo estas distribuídas ao acaso nos tratamentos que compõe esta proposta. Três machos foram escolhidos por liberarem pequenas quantidades de sêmen sob leve pressão abdominal (Kuradomi et al., 2016). Foram utilizadas 23 fêmeas, mantidas em caixas de polietileno de 750 litros, em sistema de recirculação e distribuídas aleatoriamente em cinco grupos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Delineamento experimental, identificando os tratamentos utilizados neste estudo para indução hormonal à desova de *Piaractus mesopotamicus*.

| Tratamento                                         | 1ª dose                                   | 2ª dose                                                  | N |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---|
| <b>(Salina) + (salina) (T1)</b>                    | 0,2 mL.kg <sup>-1</sup> de solução salina | 0,2 mL.kg <sup>-1</sup> de solução salina                | 3 |
| <b>(Salina) + (salina e PGF<sub>2α</sub>) (T2)</b> | 0,2 mL.kg <sup>-1</sup> de solução salina | 0,2 mL.kg <sup>-1</sup> de solução salina + 2 mL Ciosin® | 4 |
| <b>(EBHC) + (salina e PGF<sub>2α</sub>) (T3)</b>   | 0,6 mg.kg <sup>-1</sup> de EBHC           | 0,2 mL.kg <sup>-1</sup> de solução salina + 2 mL Ciosin® | 4 |
| <b>(EBHC) + (EBHC) (T4)</b>                        | 0,6 mg.kg <sup>-1</sup> de EBHC           | 5,4 mg.kg <sup>-1</sup> de EBHC                          | 6 |
| <b>(EBHC) + (EBHC e PGF<sub>2α</sub>) (T5)</b>     | 0,6 mg.kg <sup>-1</sup> de EBHC           | 5,4 mg.kg <sup>-1</sup> de EBHC + 2 mL Ciosin®           | 6 |

Salina: solução salina 0,9%. PGF<sub>2α</sub>: Prostaglandina F<sub>2α</sub>; EBHC: extrato bruto de hipófise de carpa; Ciosin®: 0,25 mg.ml<sup>-1</sup> de cloprostenol, MSD Saúde Animal.

Utilizou-se intervalo de 24 horas entre a primeira e a segunda dose para todos os tratamentos (Criscuolo-Urbinati et al., 2012). Os machos receberam 3 mg.kg<sup>-1</sup> de EBHC no momento da 2ª dose das fêmeas.

### 3.2. Amostras de plasma

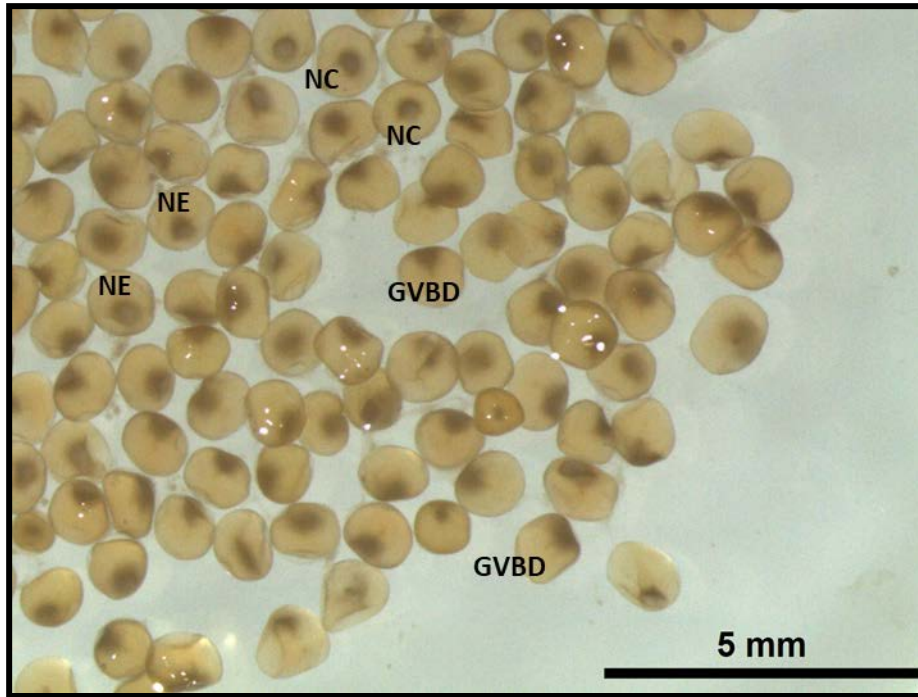
As fêmeas foram anestesiadas em solução de benzocaína (100 mg.L<sup>-1</sup> de água) com posterior coleta de sangue (~1mL) através da punção com seringa de vasos caudais para a determinação das concentrações plasmáticas de PGF<sub>2α</sub>, DHP, E<sub>2</sub> e T, em cinco períodos: imediatamente antes da primeira dose hormonal (A1), uma (1H), quatro (4H), oito (8H) e doze horas (12H) após a segunda dose.

As amostras foram centrifugadas à 1000 x g por 15 minutos à 4°C para separação do plasma que foi congelado e armazenado à -80°C. Para dosagem da PGF<sub>2α</sub>, adicionou-se ao sangue a indometacina (inibidor de PGs) com uma concentração final de 10μM imediatamente após a coleta. As concentrações plasmáticas dos hormônios foram quantificadas em duplicata por meio do método ELISA (do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”) utilizando kits comerciais:

PGF<sub>2α</sub> e DHP (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA); e E<sub>2</sub> e T (DRG International Inc., Springfield, NJ, EUA), seguindo as instruções das fabricantes. As variações limites intra e interplacas dos kits para este estudo foram de 20%, sendo que as validações já foram realizadas por Kuradomi & Batlouni (em vias de publicação) para esta espécie.

### **3.3. Amostra de ovócitos**

Logo após a coleta de sangue, através de sonda uretral NR 06 foram colhidas as amostras de ovócitos (~100 ovócitos) e fixadas em solução de SERRA (60 mL álcool 90%, 30 mL formalina e 10 mL ácido acético glacial) (Lemanova & Sakun, 1975; Romagosa et al., 1990) para avaliação da ausência, presença (e neste caso, a posição) da vesícula germinativa (GV) por estereomicroscopia (Leica M50) nos cinco períodos citados acima. O percentual foi realizado por meio da contagem de quatro grupos de ovócitos: núcleo central (NC), núcleo excêntrico (NE), GVBD e ausência de núcleo. Os ovócitos NC e NE caracterizaram-se, respectivamente, pela posição central da GV e pela posição da GV mais próxima da periferia. Já os ovócitos GVBD foram identificados quando apresentaram desintegração da GV na periferia da célula (Figura 1). Foi avaliada a mediana da frequência dos diferentes tipos de ovócitos das fêmeas por tratamento em cada coleta (Romagosa et al., 1990).



**Figura 1.** Caracterização dos ovócitos. Ovócitos com núcleo central (NC); núcleo excêntrico (NE); e quebra da vesícula germinativa (GVBD).

### 3.4. Desempenho reprodutivo

Na coleta 12H, período em que foram observadas a presença de ovócitos no interior das unidades experimentais (aproximadamente 320 UTA), as fêmeas foram extrusadas. A massa da desova obtida de cada fêmea foi registrada e em seguida foi feita a fertilização dos ovócitos com um *pool* de sêmen de machos previamente preparado. O mesmo *pool* foi utilizado para a fertilização dos ovócitos de todas as fêmeas, na seguinte proporção: ~0,5 mL de sêmen para cada 50 g de ovócitos. Posteriormente 10 mL de ovos hidratados de cada fêmea foram colocados em incubadoras experimentais de acrílico com volume de 8 L (em triplicata) para determinação das taxas de fertilidade e eclosão. A temperatura média durante a embriogênese foi  $26,70 \pm 0,40$  °C.

O percentual de fêmeas desovadas ( $\text{n}^\circ$  fêmeas desovadas /  $\text{n}^\circ$  fêmeas totais \* 100), a fecundidade relativa (massa desova / massa fêmea) e os percentuais de fertilidade e de eclosão (respectivamente 8 e 14 horas após a fertilização) foram calculados para cada tratamento. Para os cálculos das taxas de fertilidade e eclosão, aproximadamente 100 ovos de cada incubadora foram classificados como

viáveis (embriões/larvas) ou inviáveis (ovos gorados). Os percentuais foram avaliados por meio do cálculo:  $n^{\circ} \text{ ovos viáveis} / n^{\circ} \text{ ovos totais} * 100$ .



**Figura 2.** Classificação dos ovos no período de fertilidade. Ovos viáveis (VI) e inviáveis (IN).

### 3.5. Análise estatística

Os percentuais dos tipos de ovócitos encontrados foram comparados entre pós tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis. Os conjuntos de dados dos níveis plasmáticos dos hormônios foram submetidos à análise de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (teste de Levene) e analisados pelo teste de análise de variância de medidas repetidas (ANOVA repeated measures), e quando encontrado diferença significativa, foi seguido do teste de comparação de médias Fisher LSD. A fecundidade relativa foi analisada pelo teste t e as taxas de fertilidade e eclosão foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney U test. O último teste foi realizado a nível de significância  $p \leq 0,05$ , enquanto os restantes dos testes foram realizados a nível de significância de  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Comparação entre os percentuais dos diferentes tipos de ovócitos entre os tratamentos**

#### **4.1.1. Núcleo central**

Os percentuais de NC foram semelhantes entre os tratamentos nas coletas A1 e 1H ( $p>0,05$ ). Nas seguintes coletas (4H e 8H), os valores medianos de T4 (mediana: 6,89%; Q1: 2,09; Q3: 1,83 e mediana: 7,14%; Q1: 1,14; Q3: 0,90) e T5 (mediana: 4,55%; Q1: 0,24; Q3: 1,66 e mediana: 4,75%; Q1: 0,81; Q3: 1,93) foram significativamente inferiores aos de T1 (mediana: 44,55%; Q1: 0,16; Q3: 3,50 e mediana: 51,72%; Q1: 3,59; Q3: 3,97), T2 (mediana: 57,28%; Q1: 5,08; Q3: 3,04 e mediana: 52,41%; Q1: 1,00; Q3: 2,37) e T3 (mediana: 50,64%; Q1: 1,69; Q3: 2,68 e mediana: 50,63%; Q1: 1,86; Q3: 0,39) ( $p<0,05$ ) (Figura 3A).

#### **4.1.2. Núcleo excêntrico**

Assim como para NC as percentagens de NE foram semelhantes entre os tratamentos nas coletas A1 e 1H ( $p>0,05$ ). Na coleta 4H, o percentual de NE de T5 (mediana: 32,06%; Q1: 0,69; Q3: 0,64) foi menor do que o de T3 (mediana: 48,23%; Q1: 2,85; Q3: 1,66) ( $p<0,05$ ). Os percentuais de NE dos tratamentos T4 (mediana: 8,93%; Q1: 0,93; Q3: 5,49) e T5 (mediana: 3,31%; Q1: 0,35; Q3: 8,10) foram menores que os tratamentos T1 (mediana: 40,23%; Q1: 0,81; Q3: 1,65), T2 (mediana: 41,82%; Q1: 2,29; Q3: 1,79) e T3 (mediana: 43,20%; Q1: 1,23; Q3: 2,04) na coleta 8H ( $p<0,05$ ) (Figura 3B).

#### **4.1.3. GVBD**

As percentagens de GVBD nos tempos A1 e 1H foram similares entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). Os percentuais de GVBD, na coleta 4H e 8H, de T4 (mediana: 53,64%; Q1: 2,86; Q3: 2,52 e mediana: 81,25%; Q1: 6,25; Q3: 4,75) e T5 (mediana: 61,29%; Q1: 0,5; Q3: 2,12 e mediana: 91,35%; Q1: 9,30; Q3: 1,70) foram superiores

nos períodos correspondentes aos percentuais de GVBD de T1 (0%), T2 (0%) e T3 (0%) ( $p < 0,05$ ) (Figura 3C).

#### **4.1.4. Sem núcleo**

Para percentual de ovócitos sem núcleo, diferenças somente foram observadas na coleta 8H, quando T4 e T5 não apresentaram este tipo de ovócito e foram inferiores ao T1 (mediana: 8,05%; Q1: 3,15; Q3: 1,27), T2 (mediana: 5,48%; Q1: 0,85; Q3: 0,26) e T3 (mediana: 6,04%; Q1: 0,67; Q3: 1,46) ( $p < 0,05$ ) (Figura 3D).

### **4.2. Comparação entre os níveis plasmáticos dos hormônios entre os tratamentos**

#### **4.2.1. Prostaglandina $F_{2\alpha}$**

As concentrações plasmáticas médias de  $PGF_{2\alpha}$  da coleta 1H de T2 ( $5,07 \pm 0,88 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), T3 ( $5,45 \pm 0,87 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T5 ( $4,27 \pm 0,46 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) foram superiores aos de T1 ( $0,61 \pm 0,01 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T4 ( $0,22 \pm 0,46 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ). Na coleta 4H, as concentrações plasmáticas médias de  $PGF_{2\alpha}$  de T2 ( $1,52 \pm 0,18 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), T3 ( $1,65 \pm 0,51 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T5 ( $1,48 \pm 0,47 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) foram novamente superiores aos de T1 ( $0,09 \pm 0,01 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T4 ( $0,19 \pm 0,03 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ). Na coleta 8H apenas valores de T5 ( $1,47 \pm 0,66 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) foram superiores ao T1 ( $0,14 \pm 0,04 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ), e na coleta 12H os valores médios das fêmeas T4 ( $2,73 \pm 0,64 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T5 ( $2,16 \pm 0,36 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) foram superiores aos dos tratamentos T1 ( $0,06 \pm 0,01 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), T2 ( $0,32 \pm 0,08 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T3 ( $0,35 \pm 0,10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 4A).

#### **4.2.2. $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-one**

Os valores médios de DHP na coleta 1H foram similares entre os grupos ( $p > 0,05$ ), já na coleta 4H, os tratamentos T4 ( $583,07 \pm 76,46 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T5 ( $502,36 \pm 97,89 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) apresentaram valores médios cerca de 30 vezes superiores aos de T1 ( $15,43 \pm 1,58 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T3 ( $15,00 \pm 1,63 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e 10 vezes superiores aos T2 ( $55,07 \pm 18,21 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ). Na coleta 8H, níveis médios do T4 e T5

permaneceram maiores que o restante dos tratamentos ( $p < 0,05$ ). Na coleta 12H o valor médio de T4 ( $330,00 \pm 112,34 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) foi similar ao de T5 ( $218,26 \pm 87,38 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e superior ao T1 ( $21,96 \pm 2,59 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) T2 ( $85,22 \pm 38,42 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T3 ( $16,72 \pm 3,25 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 4B).

#### **4.2.3. Estradiol 17 $\beta$**

Os níveis de E<sub>2</sub> foram similares entre os tratamentos na coleta A1 ( $p > 0,05$ ). Na coleta 1H, os níveis médios de E<sub>2</sub> de T1 ( $1,93 \pm 0,23 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T2 ( $3,40 \pm 0,09 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) foram inferiores aos de T3 ( $9,13 \pm 2,01 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T5 ( $8,77 \pm 1,73 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ). No mesmo período, os níveis médios de E<sub>2</sub> de T4 ( $5,58 \pm 0,81 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) foram similares todos os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Na coleta seguinte (4H), os níveis de E<sub>2</sub> de T5 ( $13,20 \pm 2,62 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T4 ( $9,41 \pm 2,28 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) foram superiores aos T1 ( $2,12 \pm 0,19 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), T2 ( $3,40 \pm 0,16 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), O tratamento T3 ( $7,22 \pm 1,21 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) foi similar a todos os tratamentos ( $p > 0,05$ ). No tempo 8H, os níveis médios de E<sub>2</sub> de T5 ( $12,23 \pm 2,27 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) foram superiores aos de T1 ( $2,94 \pm 0,31 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), T2 ( $3,73 \pm 0,29 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T4 ( $7,09 \pm 0,53 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ) e similares aos de T3 ( $10,78 \pm 1,55 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) ( $p > 0,05$ ). Na última coleta (12H), observamos o mesmo perfil do que na coleta anterior, onde os valores médios de T5 ( $11,09 \pm 2,79 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) foram superiores aos de T1 ( $2,26 \pm 0,26 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), T2 ( $3,30 \pm 0,21 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T4 ( $4,98 \pm 0,75 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ), mas similares aos de T3 ( $6,48 \pm 1,83 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) ( $p > 0,05$ ) (Figura 4C).

#### **4.2.4. Testosterona**

Os níveis plasmáticos médios de T dos tratamentos T4 e T5 foram superiores aos dos demais tratamentos a partir da coleta 1H ( $p < 0,05$ ), sendo que na coleta 8H, os valores médios deste hormônio para T4 ( $82,80 \pm 11,32 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) e T5 ( $86,32 \pm 9,24 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) foram mais de 13 vezes superiores aos demais grupos (T1:  $5,30 \pm 0,38 \text{ ng.mL}^{-1}$ , T2:  $5,11 \pm 0,76 \text{ ng.mL}^{-1}$  e T3:  $6,30 \pm 0,58 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 4D).



### **4.3. Comparação dos níveis plasmáticos hormonais por tratamento ao longo do tempo**

#### **4.3.1. Prostaglandina $F_{2\alpha}$**

Houve elevação de  $PGF_{2\alpha}$ , de aproximadamente 44 vezes, nos tratamentos em que receberam  $PGF_{2\alpha}$  exógena (T2, T3 e T5) na coleta 1H em comparação com a coleta A1 ( $p<0,05$ ). Na coleta seguinte (4H), foi relatada uma queda em seus níveis plasmáticos nos mesmos tratamentos ( $p<0,05$ ). Posteriormente (8H), ocorreu redução nas concentrações nos tratamentos T2 e T3, enquanto os níveis no tratamento T5 se mantiveram similares ( $p>0,05$ ). Quando comparado o momento da desova (12H) com período anterior (8H), foi encontrado elevação nas concentrações do tratamento T4 ( $p<0,05$ ) (Figura 4A).

#### **4.3.2. $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-one**

Os níveis de DHP se mantiveram similares em todos os tratamentos da coleta A1 para a coleta 1H ( $p>0,05$ ). Já na coleta posterior (4H), apenas os tratamentos que possuíam fêmeas desovadas (T4 e T5) apresentaram maiores concentrações em relação à anterior, se mantendo semelhante na coleta subsequente (8H) ( $p<0,05$ ). Houve redução nos mesmos tratamentos na última coleta (12H) em relação à anterior (8H) ( $p<0,05$ ) (Figura 4B).

#### **4.3.3. Estradiol $17\beta$**

A interação entre tratamento e tempo não foi significativa nos níveis de  $E_2$  ( $p>0,05$ ).

#### **4.3.4. Testosterona**

Somente os tratamentos T4 e T5 (fêmeas desovadas) apresentaram elevações nas concentrações de T na coleta 1H em comparação com a coleta A1 ( $p<0,05$ ). Estes níveis se mantiveram similares nas coletas seguintes (4H e 8H) para estes tratamentos, diminuindo apenas próximo à desova (12H) ( $p<0,05$ ) (Figura 4D).

#### 4.4. Desempenho reprodutivo

Apenas nos tratamentos T4 e T5 foram encontradas fêmeas com ovulação e desova, quatro de seis no T4 (66,67%) e cinco de seis (83,33%) no T5. As médias de fecundidade relativa foram similares entre T4 ( $0,09 \pm 0,4$ ) e T5 ( $0,10 \pm 0,2$ ).

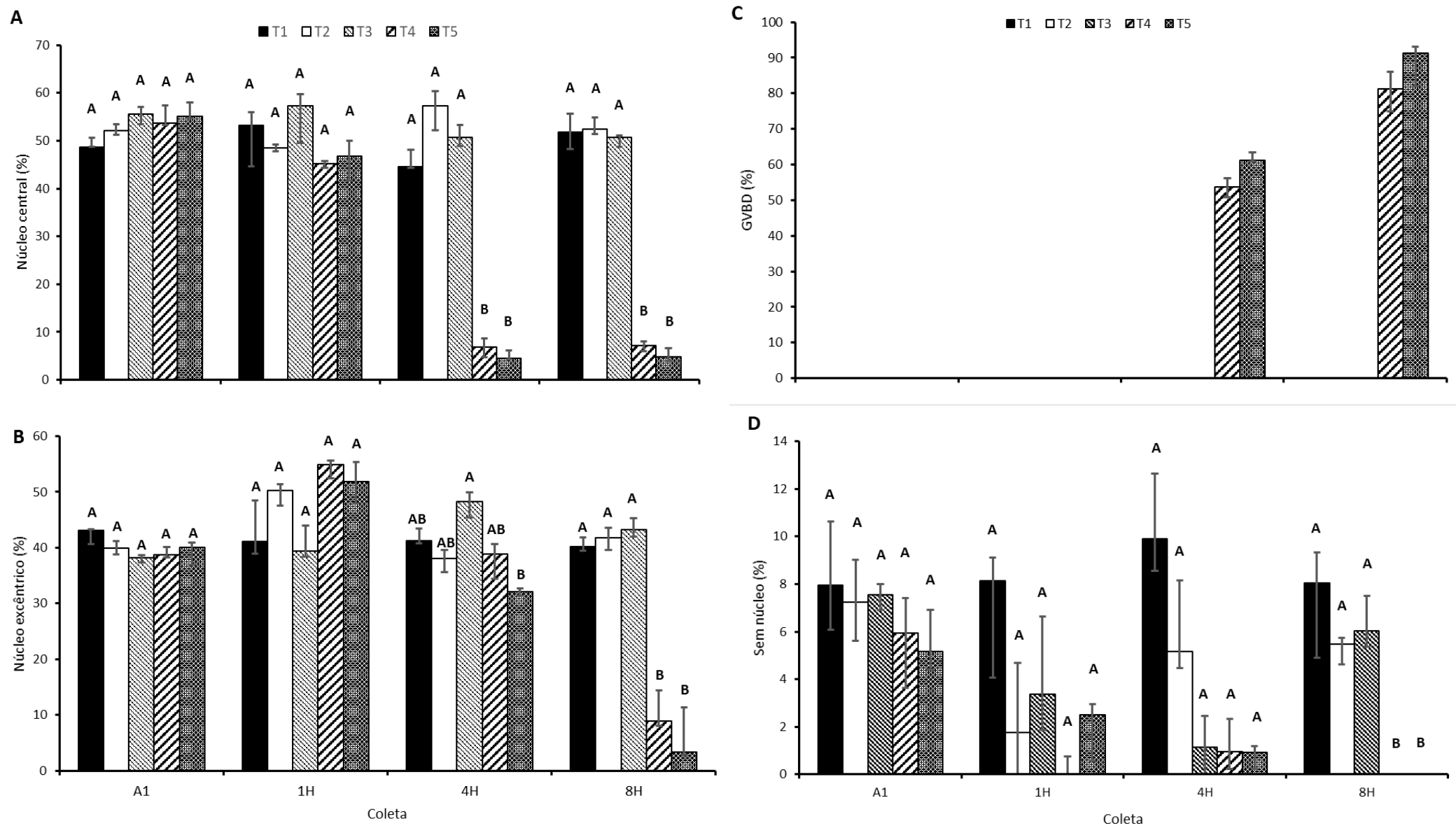
O percentual de fertilidade de T5 (mediana: 75,56; Q1: 26,95; Q3: 3,51) foi superior ao de T4 (mediana: 28,16; Q1: 14,10; Q3: 15,49) ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 5). As taxas de eclosão de T4 (mediana: 20,77; Q1: 7,95; Q3: 42,10) e T5 (mediana: 10,47; Q1: 8,13; Q3: 13,12) foram similares ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 5).

#### 4.5. Características seminais

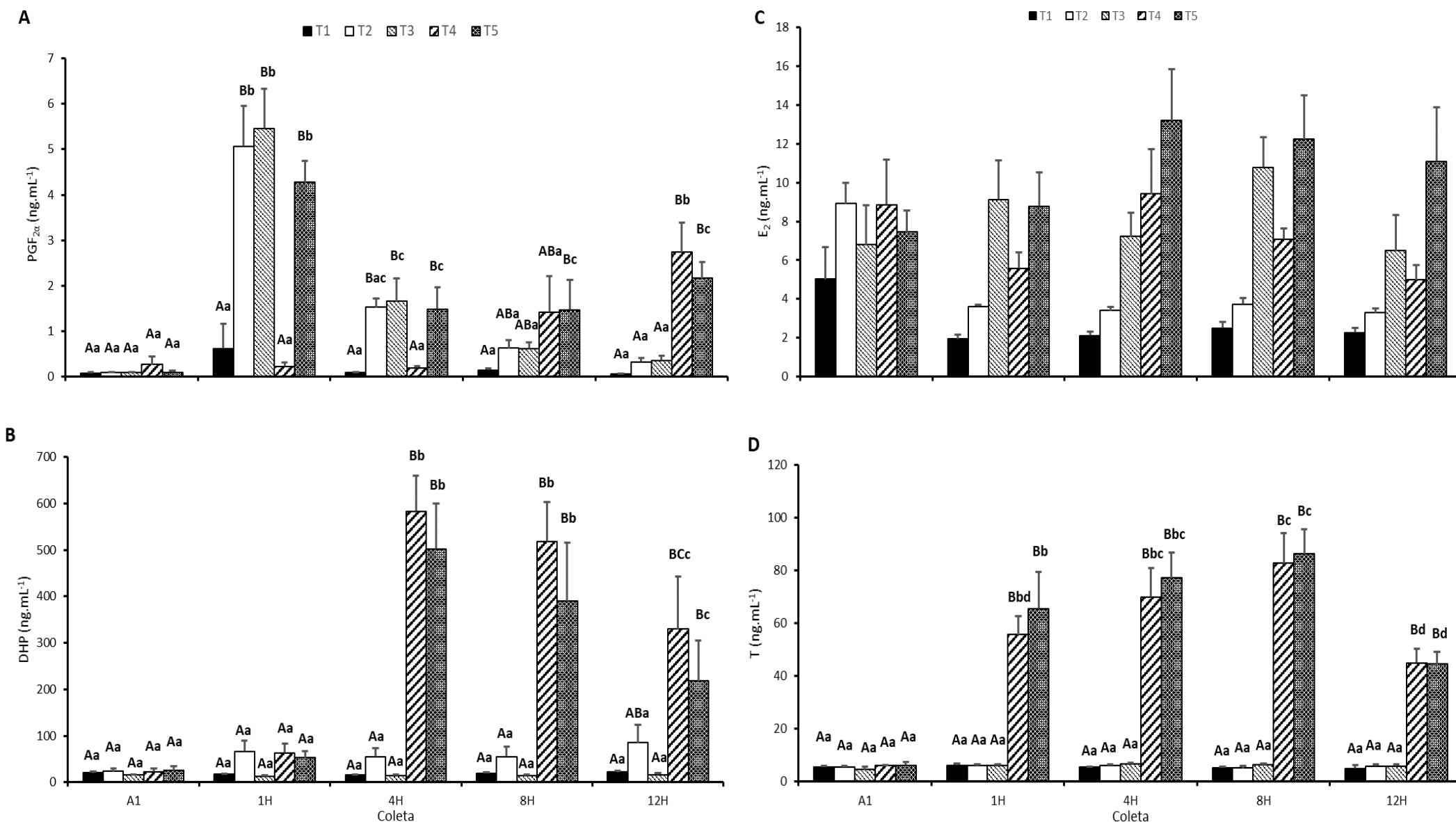
Após a fertilização dos ovos, amostras de sêmen foram coletadas para avaliação das características seminais utilizando a metodologia de Sanches et al., (2011) para cada parâmetro (Tabela 2).

**Tabela 2.** Características seminais dos machos selecionados.

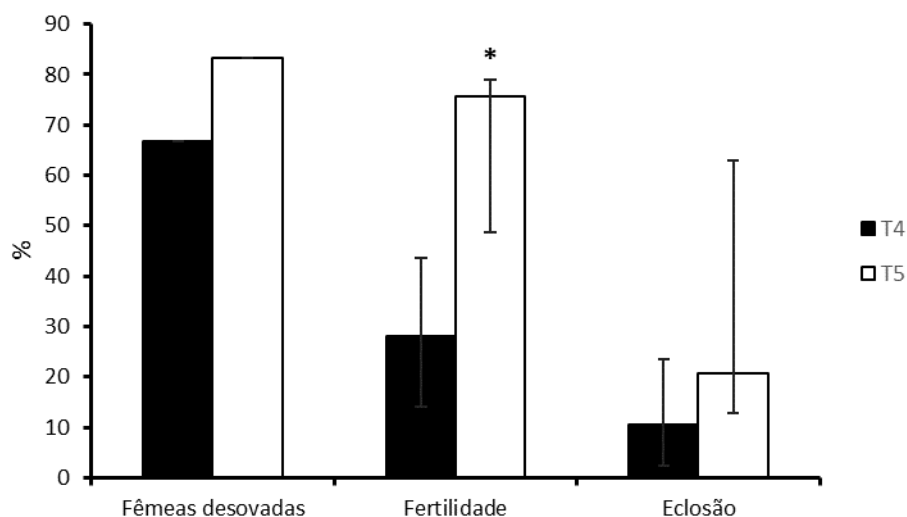
|         | Ativação (%) | Motilidade (s)   | Sobrevivência (%) |
|---------|--------------|------------------|-------------------|
| Macho 1 | 100,00       | $42,91 \pm 1,34$ | 90,34             |
| Macho 2 | 100,00       | $42,99 \pm 1,19$ | 92,89             |
| Macho 3 | 100,00       | $48,74 \pm 1,82$ | 92,96             |



**Figura 3.** Percentual dos diferentes tipos de ovócitos: núcleo central (A), núcleo excêntrico (B), GVBD (C) e sem núcleo (D) em fêmeas de *P. mesopotamicus* antes da primeira dose (A1) e uma hora (1H), quatro horas (4H) e oito horas (8H) após a segunda dose. T1: salina + salina; T2: salina + salina e PGF<sub>2α</sub>; T3: hipófise + salina e PGF<sub>2α</sub>; T4: hipófise + hipófise; T5: hipófise + hipófise e PGF<sub>2α</sub>. Dados expressos como mediana ± Q1 e Q3. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada coleta ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Perfil plasmático de Prostaglandina F<sub>2α</sub> (A), DHP (B), Estradiol 17β (C) e Testosterona (D) em fêmeas de *P. mesopotamicus* antes da primeira dose (A1) e uma hora (1H), quatro horas (4H), oito horas (8H) e doze horas (12H) após a segunda dose. T1: salina + salina; T2: salina + salina e PGF<sub>2α</sub>; T3: hipófise + salina e PGF<sub>2α</sub>; T4: hipófise + hipófise; T5: hipófise + hipófise e PGF<sub>2α</sub>. Dados expressos como média ± SEM. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada coleta. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as coletas em cada tratamento (p<0,05).



**Figura 5.** Percentual de fêmeas desovadas, taxa de fertilidade e taxa de eclosão dos ovos de fêmeas de *P. mesopotamicus*. T4: hipófise + hipófise; T5: hipófise + hipófise e PGF<sub>2α</sub>. \* Representa diferença significativa entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

A avaliação dos diferentes tipos de ovócitos ao longo do processo de indução hormonal revelou que a GVBD se iniciou na coleta 4H apenas nos tratamentos que foram observadas desovas (T4 e T5), indicando que a retomada da meiose, pré-requisitos para ovulação, só ocorre após a segunda dose hormonal nesta espécie. Estas observações corroboram com os resultados obtidos em carpas por Levavizernsky & Yaron (1986), onde a GVBD somente foi observada quando duas doses de EBHC foram aplicadas. Além disso, observamos que a ovulação só ocorreu quando duas doses de EBH foram aplicadas (tratamentos T4 e T5) e apenas nestes tratamentos foram observados aumento nos níveis de DHP durante a indução hormonal.

Neste contexto, sabe-se que concentrações elevadas de DHP estão associados com maturação final dos ovócitos e são potentes indutores de GVBD (Nagahama et al., 1983; Nagahama & Yamashita, 2008). A síntese de DHP é estimulada pelo LH nas células da granulosa, onde a enzima 20 $\beta$ -HSD converte o seu precursor 17 $\alpha$ -OHP. Portanto, corroborando resultados anteriores obtidos por Criscuolo-Urbinati et al. (2012), o uso de PGF<sub>2α</sub> exógena tem papel acessório e deve ser

utilizada como agente potencializador da ovulação, mas não como substituto da hipofiseação no pacu.

Por outro lado, avaliando agora a relação entre o uso de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e o sucesso na ovulação, observamos que no intervalo 4H, o tratamento T5 foi o único que apresentou concomitantemente ovócitos GVBD e valores superiores de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (ao controle T1). Portanto, é razoável supor que as taxas superiores de ovulação do tratamento T5 em relação ao T4 (e aos demais grupos) estão associadas a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , exógena aplicada.

Neste estudo, observamos elevação de aproximadamente 44 vezes nos níveis plasmáticos  $\text{PGF}_{2\alpha}$  da coleta A1 para a coleta 1H nos tratamentos onde os peixes foram tratados com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena (T2, T3 e T5). Nestes mesmos tratamentos, os níveis plasmáticos de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  foram mais de 7 vezes superiores na coleta 1H em comparação com os tratamentos que não receberam  $\text{PGF}_{2\alpha}$  via exógena (T1 e T4), indicando que os valores superiores encontrados na coleta 1H foram em função da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena aplicada. Na coleta 4H, novamente, os tratamentos que receberam  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena (T2, T3 e T5) apresentaram níveis superiores desta substância em comparação com os tratamentos que não receberam  $\text{PGF}_{2\alpha}$  via exógena (T1 e T4), porém os níveis foram menos expressivos, devido à redução em relação a coleta anterior (1H), indicando uma possível metabolização da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  aplicada.

Ainda com relação aos níveis  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , na coleta 8H, apenas as concentrações médias do T5 mantiveram-se superiores ao controle (T1), enquanto os outros tratamentos se tornaram similares. Na coleta 12 H foi observado que os valores médios de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dos tratamentos T4 e T5, os únicos que receberam duas doses de EBHC, tornaram-se superiores aos outros tratamentos. Neste caso, os níveis superiores de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  de T4 e T5 na coleta 12H estão certamente associados à hipofiseação, uma vez que as fêmeas do tratamento T4 não receberam  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena.

Além disso, na coleta 12H, os tratamentos que apresentaram fêmeas ovuladas (T4 e T5) apresentaram valores médios de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e DHP superiores ao tratamento controle (T1). Neste contexto, sabe-se que a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e o DHP apresentam intrínsecas conexões e são sabidamente os principais promotores da ovulação em peixes (Berndston et al., 1989; Bradley & Goetz, 1994; Kagawa et al., 2003;

Nagahama & Yamashita, 2008; Lubzens et al., 2010; Knight & Van Der Kraak, 2015; Takahashi et al., 2017).

Em relação à T, foi observado que as fêmeas dos tratamentos que receberam as duas doses de EBHC (T4 e T5) apresentaram níveis médios superiores deste hormônio a partir da coleta 1H até a coleta 12H em comparação ao T1, T2 e T3. Foram encontradas elevações similares de DHP e T ao longo do processo de indução hormonal, as quais se mantiveram superiores aos outros tratamentos durante quase todo o processo, independentemente de se ter usado ou não  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena. Sabe-se que o precursor de DHP ( $17\alpha\text{-OHP}$ ) participa também da síntese de T nos ovários por meio de uma via alternativa (Nagahama & Yamashita, 2008; Tokarz et al., 2016), explicando os perfis semelhantes encontrados entre estes hormônios. Destacamos também que elevações nos níveis plasmáticos de T na coleta 1H e posterior queda na coleta 12H ocorreu apenas nos tratamentos que desovaram (T4 e T5), corroborando outros estudos que mostram um envolvimento deste hormônio com o processo de maturação final (Fitzpatrick et al., 1986; Truscott et al., 1992)

Ainda com relação aos níveis de T, como citado acima, estes só se elevaram quando duas doses de EBH foram aplicadas (T4 e T5). Portanto, é possível que a T tenha se elevado sob a ação de níveis superiores de LH destes tratamentos, pois sabe-se que sob ação de LH, o AA é capaz de estimular a esteroidogênese, principalmente de T (Mercure & Van der Kraak, 1995). Na mesma vertente, foi demonstrado em *Oncorhynchus kisutch* que a T foi capaz de intensificar a migração e quebra da vesícula germinativa, podendo em algumas situações agir como uma substância indutora de maturação final (Fitzpatrick et al., 1986). Sabe-se também que o AA e seus metabolitos possuem relação com a síntese de esteroides (Van der Kraak & Chang, 1990; Wade & Van der Kraak, 1993; Mercure & Van der Kraak, 1995). Avaliados conjuntamente, estes achados demonstram um papel importante e pouco explorado da T sobre a maturação final e ovulação do pacu.

Vários estudos demonstraram que a desova é precedida por aumento nos níveis de DHP e redução concomitante nos níveis de  $\text{E}_2$ , em um processo denominado de “steroidogenic shift” (Levavi-Zermonsky & Yaron, 1986; Asturiano et al. 2002; Nagahama & Yamashita, 2008; Lubzens et al. 2010). Entretanto, diferindo dos trabalhos citados, observamos que a interação entre tratamento e tempo não foi

significativa nos níveis de E<sub>2</sub>. No entanto, na coleta 4H, os tratamentos T4 e T5 apresentaram níveis superiores aos tratamentos que não receberam dose de EBHC (T1 e T2). Sabe-se que, independentemente do mecanismo que leva à mudança esteroidogênica, E<sub>2</sub> e seus receptores 7TMD (GPR30 = GPER) são os responsáveis por manter a parada meiótica nos ovócitos (Pang & Thomas, 2010). Contudo, a partir da coleta 4H foi observado uma maior frequência de GVBD tanto para T4 como T5 em relação a T1 e T2, o que indica que os maiores níveis de E<sub>2</sub> encontrados no presente estudo, não foram capazes de inibir a retomada da meiose nesta espécie.

O tratamento T5 apresentou taxa de fertilidade superior (mediana de 75,56% em cinco desovas) quando comparado ao tratamento T4 (mediana de 28,16% em quatro desovas). Em relação a taxa de eclosão, os resultados obtidos foram similares entre os mesmos tratamentos. Os percentuais de taxa de eclosão encontrados foram considerados baixos (T4: mediana 10,47 e T5: 20,77%) possivelmente devido ao estresse de manejo provocado por coletas consecutivas (Campbell et al., 1992, 1994; Contreras-Sánchez et al., 1998). De acordo com estes autores, reprodutores de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) submetidos ao estresse, apresentaram atrasos na ovulação (alta UTA) e menores taxas de sobrevivência da progênie em relação aos que não sofreram estresse. No presente estudo a quantidade de UTAs registrada para a ovulação ser atingida (327±6) foi relativamente elevada e corrobora com esta hipótese, pois foi demonstrado que fêmeas de pacu que ovularam após 300 UTAs apresentaram desempenho reprodutivo insatisfatórias (Criscuolo-Urbini et al., 2012).

## 6. CONCLUSÕES

Dois picos nos níveis plasmáticos de PGF<sub>2α</sub> foram observados considerando todos os tratamentos.

O primeiro pico de PGF<sub>2α</sub> só foi observado com uso de Ciosin® (PGF<sub>2α</sub> exógena) uma hora após a segunda dose.



O segundo pico de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  apenas foi observado quando duas doses de EBH foram aplicadas, no momento da desova.

A administração isolada de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena não induziu a maturação final nem a ovulação no pacu.

A maturação final e a ovulação ocorreram apenas com a hipofiseção, independentemente do uso de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena.

O uso de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena junto com hipofiseção está associada a níveis de GVBD e de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  superiores ao controle, quatro horas após a segunda dose hormonal.

O uso de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena em conjunto com a hipofiseção elevou a taxa de ovulação de pacu em relação a fêmeas apenas hipofisadas.

A primeira dose da hipofiseção não é suficiente para induzir a maturação final em fêmeas de pacu.

Somente nos tratamentos onde desovas foram registradas foram observadas elevações nos níveis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no momento da desova.

A hipofiseção, independente do uso de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena, elevou níveis de T (uma hora após a segunda dose) e DHP (quatro horas após a segunda dose).

A interação entre tratamento e tempo não foi significativa nos níveis de  $\text{E}_2$ .

Os níveis de  $\text{E}_2$ , nos tratamentos onde desovas foram registradas, foram superiores quatro horas após a segunda dose em relação ao controle.

## 7. 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*). Rev Cient FCV-LUZ 19, 486 –494.

Aizen J.M., Kobayashi M., Selicharova I., Sohn Y.C., Yoshizaki G., Levavi-Sivan B., 2012. Steroidogenic response of carp ovaries to piscine FSH and LH depends on the reproductive phase. Gen Comp Endocrinol 178, 28-36.

Almeida, F.L., 2013. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. *Rev Bras Rep Anim.* 37, 174-180.

Andrade, D.R., Yasui, G.S., 2003. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Rev Bras Rep Anim.* 27, 166-172.

Asturiano J.F., Sorbera L.A., Ramos J., Kime D.E., Carrillo M., Zanuy S., 2002. Group-synchronous ovarian development, ovulation and spermiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenesis. *Scientia Marina* 66, 273-282.

Berndston A.K., Goetz F.W., Duman P., 1989. In vitro ovulation, prostaglandin synthesis, and proteolysis in isolated ovarian components of yellow perch (*Perca flavescens*): Effects of 17,20 $\beta$ diidrox-4-pregnen-3-one and phorbol ester. *Gen Comp Endocrinol* 75, 454-465.

Boscolo-Pereira T.S.B., Boscolo C.N.P., Moreira R.G., Batlouni S.R., 2017. The use of mGnRHa provokes ovulation but not viable embryos in *Leporinus microcephalus*. *Aquac International.* 25, 515-529.

Bradley J.A., Goetz F.W., 1994. The inhibitory effects of indometacin, nordihydroguaiaretic acid, and pyrrolidinedithiocarbamate on ovulation and prostaglandin synthesis in yellow perch (*Perca flavescens*) follicle incubates. *Prostaglandins.* 48, 11-20.

Campbell, P.M., Pottinger, T.G., Sumpter, J.P., 1992. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biol Reprod.* 46, 1140-1150.

Campbell, P.M., Pottinger, T.G., Sumpter, J.P., 1994. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. 120, 151-169.

Caneppele D., Sanches E.A., Romagosa E. 2015. Sperm production of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner 1877) and the effect of hormonal induction throughout one reproductive cycle. *J Appl Ichthyol* 31, 54–61.

Contreras-Sánchez, W.M., Schrek, C.B., Fitzpatrick, M.S., Pereira C. B., 1998. Effects of stress on the reproductive performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod.* 58, 439-447.

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

De Souza T.G., Hainfellner P., Kuradomi R.Y., Muñoz M.E., Honji R.M., Moreira R.G., Batlouni S.R. 2015. Inappropriate management conditions, especially for the regressed class, are related to sperm quality in *Prochilodus lineatus*. *Theriogenology* 8, 797–807.

Drori S., Ofir M., Levavi-Sivan B., Yaron Z. 1994. Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide: analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature. *Aquaculture* 119, 393-407.

Fitzpatrick. M.S., Van der Kraak G., Schreck C.B., 1986. Profiles of plasma sex steroids and gonadotropin in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during final maturation. *Gen Comp Endocrinol.* 62, 437-451

Fujimori C., Ogiwara K., Hagiwara A., Rajapakse S., Kimura A., Takahashi T., 2011. Expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin receptor EP4b mRNA in the ovary of the medaka fish, *Oryzias latipes*: Possible involvement in ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 332, 67–77.

Fujimori C., Ogiwara K., Hagiwara A., Takahashi T., 2012. New evidence for the involvement of prostaglandin receptor EP4b in ovulation of the medaka, *Oryzias latipes*. *Mol Cell Endocrinol* 362, 76-84.

Goetz, F.W., 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. *Fish Physiology.* IXB, 117- 170.

Hainfellner P., De Souza T.G., Muños M.E., Freitas G.A., Batlouni S.R. 2012. Spawning failure in *Brycon amazonicus* may be associated with ovulation and not with final oocyte maturation. *Arq Bras Med Vet Zoo* 64, 515-517.

Hashimoto D.T., Prado F.D, Senhorini J.A., Foresti F., Porto-Foresti F. 2015. Aquaculture of Neotropical Catfish Hybrids: Genetic Strategies for Conservation and Management. In: *Carp and Catfish: biology, behavior, and conservation strategies*. Ed: Regan, B. New York: Nova Science Publishers, Inc. pp. 1-30.

Hoogenboom M.O., Metcalfe N.B., Groothuis T.G.G., De Vries B., Costantini D., 2012. Relationship between oxidative stress and circulating testosterone and cortisol in pre-spawning female brown trout. *Comp Biochem Physiol. Part A:* 163, 379-387.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2015. Produção da Pecuária Municipal. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. 42, 39p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2016 Produção da Pecuária Municipal. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. 43, 47p.

Ittzés I., Szabó T., Kronbauer E.K., Urbanyi B. 2015. Ovulation induction in jundia (*Rhamdia quelen*, Heptapteridae) using carp pituitary extract or salmon GnRH analogue combined with dopamine receptor antagonists. *Aquac Res* 46, 2924–2928.

Jalabert B., Fostier A., 1984. The modulatory effect in vitro of oestradiol-17 $\beta$ , testosterone or cortisol on the output of 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$  dihydroprogesterone by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ovarian follicles stimulated by the maturational gonadotropin s-GtH. *Reprod Nutr Develop.* 24, 127-136.

- Kagawa, H., Tanaka, H., Unuma, T., Ohta, H., Geen, K., Ozukawa, K., 2003. Role of prostaglandin in the control of ovulation in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*, 69, 234-241.
- Knight, O.M., Van Der Kraak, G.J., 2015. The role of eicosanoids in DHP induced ovulation and spawning in *Danio rerio*. *General and Comparative Endocrinology*. 213, 55-58.
- Kuradomi, R.Y. De Souza, T.G., Foresti, F., Schulz, R.W., Bogerd, I., Moreira, R.G., Furlan, L.R., Almeida, E.A., Maschio, R.L., Batlouni, S.R., 2016. Effects of re-stripping on the seminal characteristics of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the breeding season. *Gen Comp Endocrinol*. 225, 162–173.
- Kuradomi, R.Y., Foresti, F., Batlouni, S.R., 2017. The effects of sGnRHa implants on *Piaractus mesopotamicus* female breeders. An approach addressed to aquaculture. *Aquac International*. 25, 2259-2273.
- Lemanova, N.A.; Sakun, O.F., 1975. Metodischeskie posobie pogor monalnoi stimulacii proizvoditielei karpa pré rannon polucenii licinok. *Issledivatel Skogo Instituta, Izvestiya Gosudartvennogo Nauchnom*. 88, 3-23.
- Levavi-Zermonsky, B., Yaron, Z., 1986. Changes in gonadotropin and ovarian steroids associated with oocytes maturation during spawning induction in the carp. *Gen Comp Endocrinol*. 62, 89–98.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerda, J., 2010. Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *Gen Comp Endocrinol*. 165, 367-389.
- Malison J.A., Procarione L.S., Barry T.P., Kapuscinski A.R., Kayes T.B., 1994. Endocrine and gonadal changes during annual reproductive cycle of the freshwater teleost, *Stizostedion vitreum*. *Fish Physiol and Biochem*. 13, 473-484.
- Mercure F., Van Der Kraak G., 1995. Inhibition of gonadotropin stimulated ovarian steroid production by polyunsaturated fatty acids in teleost fish. *Lipids*. 30, 547-554.
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen Comp Endocrinol*. 165, 516–534.
- Nagahama, Y., 1983. The functional morphology of teleost gonads. *Fish Physiology*, IXA, 223–275
- Nagahama, Y., Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Develop Growth Differ*. 50, 195-219.
- Pang, Y., Dong J., Thomas P., 2008. Estrogen signaling characteristics of Atlantic croaker G protein-coupled receptor 30 (GPR30) and evidence it is involved in maintenance of oocyte meiotic arrest. *Endocrinology*. 149, 3410–3426.

Pang, Y., Thomas, P., 2010. Role of G protein-coupled estrogen receptor 1, GPER, in inhibition of oocyte maturation by endogenous estrogens in zebrafish. *Develop Biology*. 342, 194-206.

Paulino, M.S., Sampaio, M., Miliorini, A.B., Murgas, L.D.S., Lima, F.S.M., Felizardo, V.O., 2011. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com estrato de buserelina. *Bol. Inst. Pesca*. 37, 39–45.

Podhorec, P., Socham, Ammar, I. B., Sokolowska-Mikolajczyk, M., Brzusk, E., Milla, S., Gosiewski, G., Stejskal, V., Simko, M., Kouril, J., 2016. The effects of GnRHa with and without dopamine antagonist on reproductive hormone levels and ovum viability in tench *Tinca-tinca*. *Aquaculture*. 465, 158–163.

Romagosa, E., Paiva, P., Godinho, H.M., 1990. Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg, 1895), induced to spawn. *Aquaculture*. 86, 105-110.

Sanches, E.A., Baggio, D.M., Piana, P.A., De Souza, B.E., Bombardelli, R.A., 2011. Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa:oocyte ratio, water volume, and in natura semen preservation. *R. Bras. Zootec.*, 40, 1-6.

Schorer, M., Moreira, R.G., Batlouni, S.R., 2016. Selection of pacu females to hormonal induction: effect of age and of evaluation methods. *Bol Inst Pesca*. 42, 901–913.

Slater C.H., Schreck C.B., Swanson P., 1994. Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp Biochem Physiol. Part A* 109, 167-175.

Takahashi T., Fujimori C., Hagiwara A., Ogiwara K. 2013. Recent Advances in the Understanding of Teleost Medaka Ovulation: The Roles of Proteases and Prostaglandins. *Zool Sci* 30, 239-247

Takahashi, T., Hagiwara, A., Ogiwara, K., 2017. Prostaglandins in teleost ovulation: A review of the roles with a view to comparison with prostaglandins in mammalian ovulation, *Mol Cell Endocrinol*. In press.

Targońska, K., Kucharczyk, D., 2011. The application of hCG, CPH and Ovopel in successful artificial reproduction of goldfish (*Carassius auratus*) under controlled conditions. *Reprod Domest Anim*. 46(4), 651-5.

Tokarz, J., Moller, G., de Angelis, M.H., Adamski, J. Steroid in teleost fishes: A functional point of view. *Steroids*. 103, 123-144.

Truscott, B., So, Y.P., Nagler, J.J., Idler, D.R., 1992. Steroids involved with final oocyte maturation in the winter flounder. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol*. 42, 351-356

Urbinati E.C., Goncalves F.D., Takahashi L.S., 2010. Pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: Bernardo Baldisseroto; Levy de Carvalho Gomes. (Org.). Espécies Nativas para piscicultura no Brasil. 2 ed. Santa Maria: Editora UFSM, 1-606.

Van Der Kraak G., Chang, J., 1990. Arachidonic acid stimulates steroidogenesis in goldfish preovulatory ovarian follicles. *General and Comparative Endocrinology*. 77, 221-228.

Viveiros A.T.M., Goncalves A.C., Chiacchio I.M., Nascimento A.F., Romagosa E., Leal M.M. 2015. Gamete quality of streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) after GnRHa and dopamine antagonist treatment. *Zygote* 23: 212–221.

Wade M., Van Der Kraak G., 1993. Arachidonic acid and prostaglandin E<sub>2</sub> stimulate testosterone production by goldfish testis In Vitro. *General and Comparative Endocrinology*. 90, 109-118.

Zaniboni – Filho, E., Weingart, M., 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 31, 367-373.