

Estudo comparativo da indução hormonal da espermiacção em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa

Danilo Pedro Streit Jr., Gentil Vanini de Moraes*, Ricardo Pereira Ribeiro, Walangierly da Costa Caçador, Eduardo Shigueiro Sakaguti, Jayme Aparecido Povh e Ederval Donizeti de Souza

Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência.

RESUMO. Foram utilizados 3 tratamentos para a reprodução do piavuçu, *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae): extrato de hipófise de frango (EHF), extrato de hipófise de coelho (EHCo) e, como controle, o extrato de hipófise de carpa (EHC). Cinquenta e cinco machos, pesando em média 0,69kg foram distribuídos aleatoriamente nos 3 tratamentos. O volume de sêmen produzido foi maior ($p < 0,05$) nos tratamentos com EHF (0,18mL) e EHC (0,16mL), em comparação aos 0,03mL dos animais tratados com EHCo. A concentração de espermatozoides/mm³ foi semelhante ($p > 0,05$) nos 3 tratamentos. Já o total de espermatozoides produzidos na liberação do sêmen, apresentou diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos com EHF e EHCo. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos em relação ao vigor espermático e à motilidade progressiva. O estudo revelou que o EHF foi eficiente na indução gonadal de machos de *Leporinus macrocephalus*, mas o EHCo foi insignificante, principalmente, quanto ao volume produzido.

Palavras-chave: Aquicultura, espermatozoides, peixe, reprodução induzida.

ABSTRACT. Comparative study of hormonal inducement in piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) semen with broiler chickens, rabbit and hypophysis extracts. Three treatments for piavuçu, *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae) reproduction were utilized: broiler chicken hypophysis extract (BCHE), rabbit hypophysis extract (RHE) and, as control, carp hypophysis extract (CHE). Fifty-five males with 0.69kg, on average, were randomly allotted in the three treatments. Semen volume produced were higher ($p < 0.05$) in the treatments with BCHE (0.18mL) and CHE (0.16mL) in comparison with 0.03mL from animals treated with RHE. The spermatozoa/mm³ were similar ($p > 0.05$) in the three treatments. There was difference ($p < 0.05$) in relation to total spermatozoa produced between animal treated with BCHE and RHE. There was not any difference ($p > 0.05$) among the treatments, in relation of spermatoc vigor and progressive motility. The study revealed that BCHE was efficient on males gonadal inducement of *Leporinus macrocephalus*, but RHE was not efficient, mainly, for produced volume.

Key words: Aquaculture, spermatozoon, fish, induced reproduction.

Introdução

O extrato de hipófise de peixe é o indutor gonadal mais utilizado em todo o mundo (Ceccarelli *et al.*, 2000) devido, entre outros fatores, à sua fácil manipulação (Donaldson e Hunter, 1983). O custo, porém, tem se tornado o maior inconveniente para sua utilização no Brasil, pois extratos de hipófise de carpa de qualidade são importados e cotados em moeda internacional.

O uso do extrato de hipófise de aves tem mostrado bons resultados em diversas espécies de peixes, tanto em machos quanto em fêmeas. A desova e a espermiacção de *Paramisgurnus dabryanus*, *Misgurnus anguillicaudatus* e *Hypophthalmichthys*

molitrix foram obtidas com sucesso usando o extrato de hipófise de frango (Yu *et al.*, 1995). Para Amaral Jr. (1995), o extrato de hipófise de frango mostrou ser mais efetivo na indução e na desova de tenca (*Tinca tinca*). O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) apresentou maturação gonadal após a indução com extrato de hipófise de frango (Barroso, 1999).

Estudos com hipófises de outros animais têm sido testados na indução reprodutiva de peixes, como: hipófise de anuro (Inyang e Hettiarachchi, 1994) e hipófise de mamíferos (Streit Jr., 2002).

O extrato de hipófise de peixe foi pesquisado na maioria das espécies reofílicas brasileiras, em fêmeas e machos. Dentre elas, destacam-se o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Godinho e Godinho, 1986),

piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (Bedore, 1999), curimatá (*Prochilodus lineatus*) (Gomes *et al.*, 1985), curimatá (*Prochilodus affinis*) (Sato *et al.*, 1996a), matrinhã (*Brycon cephalus*) (Bernardino *et al.*, 1993), piau branco (*Scizodon Knerii*) e piapara (*Leporinus elongatus*) (Sato *et al.*, 1996b), entre outras espécies.

O piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) é uma espécie de piracema que se reproduz na cabeceira dos rios de novembro a janeiro (Britsky, 1999). Por ser uma espécie reofilica própria para a aquicultura, necessita de indução reprodutiva (Castagnolli, 1992).

O objetivo deste estudo foi comparar a qualidade do sêmen de piavuçu, *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae) induzido com extrato de hipófise de frango e de coelho, com o sêmen daqueles induzidos com extrato de hipófise de carpa.

Material e métodos

O experimento foi realizado em uma piscicultura localizada no município de Apucarana, Estado do Paraná, a qual mantém convênio com a estação de piscicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM)/Codapar e o Laboratório de Reprodução da UEM, durante os meses de dezembro de 2001 e janeiro de 2002.

Os animais foram retirados de um viveiro de 8000m², com renovação de água de 5% ao dia, onde eram alimentados duas vezes por dia (manhã e tarde). Os machos de piavuçu que apresentavam a característica reprodutiva citada por Woynarovich e Horváth (1983) - com a liberação de gotas de esperma espesso ao se comprimir o abdômen, levemente, no sentido encéfalo-caudal - foram selecionados para o experimento. Foram utilizados 55 machos de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) que pesaram, em média, 0,69kg e foram transportados para o laboratório de reprodução em uma caixa de 2400L.

No laboratório, os peixes foram identificados na nadadeira dorsal e pesados para determinar a dose hormonal, depois foram acondicionados em tanques. Os 3 tanques de fibra de vidro utilizados para a manipulação possuíam capacidade para 5000 litros, dispostos lado a lado acondicionados sobre o piso da sala de manipulação, com renovação constante de 0,06L de água/segundo.

Cada tanque de manipulação continha uma coluna d'água de 150cm com temperatura de 24±1°C, pH de 6,5±0,2 e 6±0,5mg/L de oxigênio dissolvido mantido através de um soprador.

As hipófises de frango foram obtidas de animais com aproximadamente 45 dias de idade, provenientes da linha de abate de um abatedouro de Maringá. As hipófises de coelhos foram coletadas de animais abatidos na Fazenda Experimental de Iguatemi da UEM. A idade dos coelhos foi de 70 dias de vida. A

hipófise de carpa foi adquirida no mercado, pronta para ser utilizada.

Para a retirada das hipófises, foi feito um corte que iniciava na região occipital dos animais. O corte passou por entre o olho e o ouvido, chegando ao meio da boca, deixando expostos, dessa forma, o cérebro e a cela túrcica, locais de onde as hipófises foram extraídas. No caso das aves, o corte foi efetuado com uma faca afiada. No caso dos coelhos, com serra fita usada em açougues. A extração das hipófises da cela túrcica foi efetuada utilizando cureta odontológica ou agulhas de injeção de 25x8mm.

As hipófises de coelhos e de frangos, depois de coletadas, foram imediatamente colocadas em recipientes de vidro contendo acetona pura para análise, de modo que cobrisse as hipófises, que ficaram acondicionadas por 10 horas. Após esse período, foi renovada a acetona para as hipófises poderem permanecer nos vidros por mais 10 horas. Posteriormente, essas hipófises foram pesadas e embaladas em papel filtro e colocadas em um dissecador. Decorridas oito horas desse processo, as hipófises estavam prontas para serem transformadas em extrato de hipófise. Elas foram maceradas em Gral de 100mL, adicionando solução fisiológica a 0,7% de NaCl em uma proporção de 4mg de hipófise para 1mL de solução salina (Woynarovich e Horváth, 1983). As hipófises de coelhos e de frangos foram processadas e maceradas e, depois de transformadas em extrato, foram diluídas segundo as recomendações de Woynarovich e Horváth (1983).

Após o processo de seleção, transporte e acomodação dos piavuçus, foi efetuada a indução hormonal (Tabela 1). A quantidade de extrato de hipófise de carpa utilizada foi de acordo com as recomendações de Woynarovich e Horváth (1983). A quantidade de extrato de hipófise de frango baseou-se nos trabalhos de Barroso (1999), que recomendou dobrar a dosagem de extrato de hipófise de frango em relação ao de carpa quando trabalhou com o *Piaractus mesopotamicus*. A posologia de extrato de hipófise de coelho foi determinada a partir de observações obtidas em experimentos pilotos com esta e outras espécies induzidas no laboratório dessa instituição. Ficou constatado melhor desempenho na produção de sêmen com a dosagem utilizada neste estudo.

Tabela 1. Esquema de aplicação dos extratos de hipófises de carpa, de aves e de coelhos (mg/kg de peso vivo) em *Leporinus macrocephalus* administrada em dose única, visando a indução reprodutiva

Sexo	Aplicação	Extrato de hipófise		
		Carpa	Frango	Coelho
Macho	Única	3,0	5,0	7,0

A temperatura da água foi monitorada de hora em hora com um termômetro de gradação Celsius, com

o intuito de obter a unidade térmica acumulada (UTA). Foi adotado, como padrão, 220 UTA para a coleta do sêmen de cada animal, em função de observações de experimentos pilotos. Foi observado que a esta temperatura 100% dos machos de piavuçu liberavam sêmen em maior quantidade que o controle, sem indução.

Para a coleta dos gametas, cada animal foi retirado do aquário enrolado em uma toalha úmida e apoiado sobre uma porção de espuma de densidade 30, em cima da mesa de manipulação. Em seguida, o orifício urogenital e a nadadeira anal foram secados com papel-toalha e o sêmen foi coletado em seringas (Billard *et al.*, 1995). Os peixes foram imediatamente devolvidos ao tanque de manipulação.

Os procedimentos realizados para avaliação dos parâmetros quantitativos do sêmen são apresentados a seguir, segundo as recomendações de Sorensen Jr. (1979) e adaptados para peixes.

Volume: o sêmen foi coletado em seringas graduadas em escala de 0,1mL.

Concentração de espermatozoides: o sêmen foi diluído em um Becker, utilizando a pipeta de Shalli (0,02mL), em 40mL de formol-salina tamponada, resultando a diluição de 1:2000. Feita a diluição, preencheu-se, por capilaridade, a câmara de Neubauer e contaram-se os espermatozoides de 5 quadrados do campo de 1mm². Os espermatozoides contados nos quadrados referidos foram somados e divididos em 80 quadrados pequenos. Em seguida, foram multiplicados por 400 quadrados pequenos, de acordo com a diluição e a altura da câmara corrigida. Após esse processo, obteve-se a quantidade de espermatozoides por mm³ de sêmen.

Motilidade progressiva e vigor espermático: a motilidade foi avaliada subjetivamente, para expressar a porcentagem total de espermatozoides móveis. Assim, como a motilidade, o vigor foi avaliado subjetivamente e baseou-se na velocidade com que o espermatozoide se deslocou no campo ótico. Para essas avaliações, foi preparada lâmina de microscopia ótica com 1 gota de sêmen e 8 gotas de água destilada (pH 6,1) à temperatura ambiente, levadas ao microscópio de contraste de fase em aumento de 400X. Para variável motilidade progressiva, utilizou-se um escore de 0 à 100%, e para o vigor espermático, um escore de 0 a 5 pontos. As pontuações mais elevadas representaram espermatozoides mais ativos.

Com os valores dos volumes individuais e os da concentração espermática, foi calculado o número de espermatozoides totais liberados por colheita.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com os 3 tratamentos arranjados em fatorial de 3 hormônios e 3 repetições (semanas) por tratamento. Cada animal foi considerado uma unidade experimental. Foram tratados 18 piavuços com extrato de hipófise de carpa, 19 com extrato de

hipófise de frango e 18 com extrato de hipófise de coelho.

O volume de sêmen, a concentração de espermatozoides, o número de espermatozoides totais, a motilidade progressiva e o vigor foram analisados separadamente, segundo o modelo estatístico a seguir:

$$Y_{ijk} = \mu + H_i + S_j + HS_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} = observação referente ao macho (k), recebendo o hormônio (i) na semana (j);

μ = constante geral;

H_i = efeito do hormônio(i);

S_j = efeito da semana(j);

HS_{ij} = interação entre o hormônio (i) e a semana(j);

ε_{ijk} = erro aleatório associado à observação do animal (k) que recebeu o hormônio (i) na semana (j);

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS (1992). As variáveis peso, concentração de espermatozoides, volume e número de espermatozoides totais produzidos foram analisadas por meio do procedimento GLM, aplicando teste Tuckey ($p < 0,05$). Para as variáveis motilidade progressiva e vigor espermático foi aplicada a distribuição Gamma com a função de ligação Log e o procedimento de análise GENMOD.

Resultados e discussão

O volume médio de sêmen produzido foi maior ($p < 0,05$) nos animais tratados com extrato de hipófise de frango (EHF) (0,18mL) e extrato de hipófise de carpa (EHC) (0,16mL) em comparação aos 0,03mL dos animais tratados com extrato de hipófise de coelho (EHCo) (Tabela 2).

Tabela 2. Volume médio de sêmen, concentração e número total médio de espermatozoides, motilidade progressiva e vigor espermático obtidos de sêmen colhido de *Leporinus macrocephalus* induzidos com extratos de hipófises de carpa (EHC), frango (EHF) e coelho (EHCo), além do peso médio dos animais induzidos

Variáveis	Tratamentos		
	EHC	EHF	EHCo
Peso (Kg)	0,65±0,24a	0,77±0,22a	0,67±0,23a
Volume (mL)	0,16±0,1a	0,18±0,1a	0,03±0,04b
*Concentração de espermatozoides /mL	13,2±6,7a	17,2±8,2a	14,8±9a
*Número totais de espermatozoides liberados no sêmen	2,1±1,4ab	3,2±2,6a	1,0±1,0b
Motilidade espermática progressiva(%)	24,8±18,6a	29,6±35,9a	22,1±30a
Vigor espermático (0-5 pontos)	2,0±1,0a	1,8±1,38a	1,6±1,4a

Letras diferentes, nas linhas diferem ($p < 0,05$); *Valor observado deve ser multiplicados por 10⁹

Apesar do volume de sêmen ser diminuto em todos os tratamentos, o EHCo ou parece não apresentar uma concentração suficiente de hormônios gonadotróficos, ou os hormônios gonadotróficos

existentes neste extrato não são compatíveis com as gônadas de *Leporinus macrocephalus*.

Dentre os GnRH (fator liberador de gonadotrofinas) encontrados em hipotálamos de peixes, o cGnRH (fator liberador de gonadotrofinas de frango) é um dos quatro principais (Van Der Kraak *et al.*, 1997). Então, supõe-se haver uma boa quantidade de receptores na hipófise de peixe para este cGnRH que, por sua vez, estimula a liberação de gonadotrofinas GtH-I e GtH-II, similares às encontradas no EHF.

O volume médio de sêmen produzido pelos machos induzidos com EHF e EHC (0,17mL) pode ser considerado reduzido, comparando com outras espécies de peixes. O volume de sêmen, porém, varia, entre outros fatores, quanto ao indutor e à espécie que está sendo induzida, como é verificado no trabalho de Zaniboni Filho (1995), que induziu pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com EHC, obtendo 12,1mL de sêmen e 14,4mL quando utilizou LHRH-a (fator liberador de hormônio luteínico-análogo). Kucharczyk *et al.* (1997) obtiveram 4,3mL de sêmen de ide (*Leuciscous idus* L.) induzidos com EHC.

A concentração de espermatozoides/mm³ foi semelhante ($p > 0,05$) nos 3 tratamentos (média de $14,6 \times 10^6$). Entretanto, no total de espermatozoides liberado no sêmen, que é resultante do produto do volume e concentração, existiu diferença ($p < 0,05$) entre o sêmen produzido pelos animais tratados com EHF e os tratados com EHC_o (Tabela 2). A produção total média de células espermáticas foi três vezes maior nos animais tratados com o EHF em comparação aos tratados com o EHC_o, e duas vezes maior ao controle. O total de espermatozoides produzidos pelos animais induzidos com EHC_o foi afetado pelo volume de sêmen produzido pelos machos, pois a concentração de espermatozoides apresentaram, em números absolutos, valores muito próximos.

A concentração espermática pode variar dentro de um mesmo gênero, pois Murgas *et al.* (1999) encontraram uma concentração de 16×10^9 espermatozoides/mL quando induziram piapara (*Leporinus obtusidens*). Essa concentração é dez vezes maior que a encontrada no estudo com piavuçu (*Leporinus macrocephalus*). Características fisiológicas reprodutivas da espécie, como é o caso do *Leporinus macrocephalus*, podem determinar essa diferença de concentração quando comparado com o *Leporinus elongatus*, apesar do gênero ser o mesmo.

Motilidade espermática progressiva, assim como o vigor espermático, não apresentou diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 2). Bromage (1995) mencionou que a qualidade dos espermatozoides produzidos e, neste caso, pode-se considerar o vigor espermático e a motilidade progressiva, estão diretamente ligados ao estado nutricional, idade e ao genótipo do animal. Porém, a motilidade progressiva

é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a qualidade do sêmen (Bromage, 1995; Honeyfield e Krise, 2000). Hafez e Hafez (2000) citaram que a motilidade é essencial para a fertilização em espermatozoides saudáveis.

Resultados obtidos para a motilidade progressiva espermática, por diferentes autores, com outras espécies de peixes nativas da América do Sul, estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3. Motilidade espermática progressiva observada por diferentes autores em diferentes espécies de peixes reofílicos, utilizando análogo do fator liberador de hormônio gonadotróficos (GnRH-a), extrato de hipófise de carpa (EHC), de frango (EHF) e de coelho (EHC_o)

Autores	Espécie	Hormônio utilizado	Motilidade espermática progressiva (%)
Silveira <i>et al.</i> (1990)	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	EHC	90,00
Murgas <i>et al.</i> (2002)	<i>Leporinus obtusidens</i>	EHC	81,07
Miliorini <i>et al.</i> (2002)	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	EHC	99,10
Pardo-Carrasco (2001)	<i>Brycon siebenthalae</i>	EHC	49,00
		GnRH-a	86,25
Streit Jr. <i>et al.</i> (2002)	<i>Prochilodus lineatus</i>	EHC	50,00
		EHF	68,20
		EHC _o	60,00

Os valores encontrados para motilidade espermática progressiva, neste trabalho, não podem ser considerados comprometedores, pois ocorreu uma variabilidade elevada para esses parâmetros no resultado individual de cada animal. Alguns animais apresentaram valores menores que 10% de motilidade e outros apresentaram 90% de motilidade espermática. Como não foram encontrados outros estudos com sêmen de *Leporinus macrocephalus*, não foi possível avaliar se é característica dessa espécie ou algum outro fator como os citados por Bromage (1995) e Honeyfield e Krise (2000).

Os resultados encontrados neste estudo apontam um melhor desempenho dos EHF e EHC em relação ao EHC_o. Quanto ao volume e ao número de células produzidas, em números absolutos, o EHF foi sempre superior aos demais tratamentos, exceto para o vigor espermático. O EHC_o mostrou-se ineficiente especialmente em relação ao volume, o que torna desaconselhável a utilização desse indutor para *Leporinus macrocephalus*. Recomenda-se, todavia, repetir o experimento a fim de verificar a amplitude de variação dos valores de motilidade espermática.

Referências

AMARAL JÚNIOR, H. Utilização de extrato hipofisário de galinha para a indução à desova de tenca. Opção de banco de hipófise para o pequeno produtor rural. In: ENCONTRO RIOGRANDENSE DE TÉCNICOS EM AQUICULTURA, 6., 1995, Ibirubá. *Anais...* Ibirubá: UFRGS, 1995. p.154-162.

BARROSO, R. M. Utilização do extrato bruto de hipófise de frango de corte (*Gallus domesticus*) na indução da

- maturação final oocitária e da desova em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (HOLMBERG, 1887). 1999. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 1999.
- BEDORE, A. G. *Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (Piaractus mesopotamicus) e de piracanjuba (Brycon orbignyanus)*. 1999. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.
- BERNARDINO, G. *et al.* Propagação artificial do matrinhã, *Brycon cephalus* (GUENTHER, 1869), (TELEOSTEI, CHARACIDAE). *Boletim Técnico do Cepta*, Pirassununga, v.6, n.2, p.1-9, 1993.
- BILLARD, R. *et al.* Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). *Broodstock management and egg and larval quality*. Oxford: Blackwell Science, 1995, cap.2, p. 25-52.
- BRITSKI, H. A. *Peixes do Pantanal. Manual de identificação*. Brasília: Embrapa-SPI, 1999.
- BROMAGE, N. Broodstock management and seed quality-General considerations. In: BROMAGE, N.; ROBERTS, R. J. (Ed.). *Broodstock management and egg larval quality*. Oxford: Blackwell Science, 1995. cap.1, p.1-24.
- CASTAGNOLLI, N. Espécies nativas próprias para a piscicultura. In: CASTAGNOLLI, N. (Ed.) *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, 1992. cap.8, p.59-70.
- CECCARELLI, P. S. *et al.* *Dicas em piscicultura: perguntas e respostas*. Botucatu: Santina Gráfica Editora, 2000.
- DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. A. Induced final maturation, ovulation, and spermiation. In: HOAR, W. S. RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). *Fish Physiology*. Orlando: Academic Press, 1983. cap.7, p.352-403.
- GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. Induced spawning of the pacu *Colossoma mitrei* (Berg 1895), by hypophysation with crude carp pituitary extract. *Aquaculture*, Amsterdã, v.55, n.1, p.69-73, 1986.
- GOMES, J. M. M. *et al.* Uso de hipófise de carpa (*Cyprinus carpio*) e curimatã (*Prochilodus scrofa*), na desova da carpa comum. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 4, 1985, Curitiba. *Resumos...* Curitiba: AEP - SUL, 1985. p.60.
- HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. *Reproduction in farm animals*. 7.ed. Philadelphia: Lippicott Williams e Wickins, 2000.
- HONEYFIELD, D. C.; KRISE, W. F. Measurement of milt quality and factors affecting viability of fish spermatozoa. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Ed.) *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. cap.1, p.49-58.
- INYANG, N. M.; HETTIARACHCHI, M. Efficacy of human chorionic gonadotropin (hCG) and crude pituitary extract of fish and frog in oocyte maturation and ovulation in African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell, 1822 and *Clarias gariepinus* Burchell, 1822 and *Clarias anguillaris* L., 1762. *Aquacult. Fish. Manag.*, Oxford, v.25, n.3, p.245-258, 1994.
- KUCHARCZYK, D. *et al.* Induced spawning in bream, *Abramis brama* (L.), using carp and bream pituitary extract and HCG. *Aquacult. Res.*, Oxford, v.28, n.2, p.139-144, 1997.
- MILIORINI, A. B. *et al.* Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) à 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.26, n.3, p.209-211, 2002.
- MURGAS, L. D. S. *et al.* Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.23, n.3, p.246-248, 1999.
- MURGAS, L. D. S. *et al.* Viabilidade seminal da piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen à 4°C. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.26, n.3, p.211-213, 2002.
- PARDO-CARRASCO, S. C. *Reprodução induzida do yamú, Brycon siebenthalae (Pisces Characiforme)*. 2001. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.
- SAS Institute Inc. SAS technical report: Release 6.07. Cary: NC, 1992.
- SATO, Y. *et al.* Hypophysation of the anostomid fish white-piau *Schizodon knerii* from the Rio São Francisco basin. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v.48, n.1, p.63-70, 1996a.
- SATO, Y. *et al.* Hypophysation of the fish *Prochilodus affinis* from the Rio São Francisco basin, Brazil. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnico*, Belo Horizonte, v.48, n.1, p.55-62, 1996b.
- SILVEIRA, W. F. *et al.* Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg), proveniente de reprodução induzida. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v.17, n.1, p.1-13, 1990.
- SORENSEN Jr., A. M. *A laboratory for animal reproduction*. 4.ed. Massachusetts: American Press. 1979.
- STREIT Jr, D. P. *Extrato de hipófise de frango e de coelho como indutores gonadais de pacu (Piaractus mesopotamicus) macho e fêmea, em comparação com o extrato de hipófise de carpa*. 2002. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2002.
- STREIT Jr., D. P. A. *et al.* Extrato de hipófise de frango e coelho como indutores gonadais de machos de piauçu (*Leporinus macrocephalus*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 12, 2002, Goiânia. *Anais...* Goiânia: GTP/BC/UFG, 2002. p.344.
- VAN DER KRAAK, G. *et al.* *Reproduction*. In: EVANS, D. H. (Ed.). *The physiology of fishes*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1997.
- ZANIBONI FILHO, E. Utilização do LHRH-a para indução à espermiacão e desova do pacu-caranha *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Biotemas*, Florianópolis, v.8, n.1, p.36-45, 1995.
- YU, J. Y. L. *et al.* Comparative effects of avian and piscine gonadotrophins on gonadal steroidogenesis, and of avian and piscine pituitaries on induction of spermiation and ovulation in the loach and white silver carp. *Aquaculture*, Amsterdam, v.135, n.1, p.59-72, 1995.

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

Received on April 01, 2003.

Accepted on November 06, 2003.