

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA

EFEITOS DA APLICAÇÃO DO LHRH, ASSOCIADO A UM ANTAGONISTA DE DOPAMINA, NA MATURAÇÃO FINAL OVOCITÁRIA E NA DESOVA DE FÊMEAS DE PACU, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) (TELEOSTEI, CHARACIDAE), EM DOIS DIFERENTES LOCAIS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Hugo Pereira Godinho

ALBERT BARTOLOMEU DE SOUSA ROSA

Florianópolis (SC)

1992

EFEITOS DA APLICAÇÃO DO LHRH, ASSOCIADO A UM  
ANTAGONISTA DE DOPAMINA, NA MATURAÇÃO FINAL  
OVOCITÁRIA E NA DESOVA DE FÊMEAS DE PACU, *Piaractus*  
*mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887)(TELEOSTEI,  
CHARACIDAE), EM DOIS DIFERENTES LOCAIS

por

ALBERT BARTOLOMEU DE SOUSA ROSA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de  
mestre no Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, pela Comissão  
formada por:

Presidente:

*Hugo P Godinho*

Prof. Hugo Pereira Godinho

Membro:

*Santo Zacarias Gomes*

Prof. Santo Zacarias Gomes

Membro:

*Vinicius Ranzani Cerqueira*

Prof. Vinicius Ranzani Cerqueira

Florianópolis (SC), 20 de agosto de 1992.

*À minha mulher Ilka e ao meu  
filho Alexandre, pelo amor que  
vocês me proporcionam.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor HUGO PEREIRA GODINHO, pela orientação e apoio recebidos na elaboração desta Dissertação.

Ao Dr. ELISEU ROBERTO DE ANDRADE ALVES e ao Dr. FRANCISCO EVANDRO PARREIRA, que tornaram possível minha participação neste Curso de Mestrado em Aqüicultura.

Ao Dr. LAERTE BATISTA DE OLIVEIRA ALVES e ao Dr. GERALDO BERNARDINO, ambos do CEPTA, pelo apoio recebido à minha participação neste Curso de Mestrado e à realização desta Dissertação.

Ao Dr. PETER GARADI, por sua orientação nos primeiros passos desta Dissertação.

Ao Professor SANTO ZACARIAS GOMES e ao colega CARLITO ALOÍSIO KLUNK, pela amizade e apoio recebidos na UFSC.

Ao Dr. CIRÍACO SERPA DE MENEZES, ao Dr. GEORGE FERNANDO LUCÍLIO DE BRITO e à Dra. MÁRCIA MACHADO TEIXEIRA, pela colaboração prestada à concretização deste Curso de Mestrado.

Aos colegas MARIA CECÍLIA NUNES DA SILVA, FERNANDO ALVES DE SOUSA, OSMAR ÂNGELO CANTELMO, ANTÔNIO FERNANDO BRUNI LUCAS, JOSÉ MIGUEL SALAZAR GAMBOA e NICOLAS CHAPARRO MUÑOZ, pelo auxílio quando da realização deste trabalho.

Ao Dr. DEONI LUIZ SEGALIN, pelo incentivo à elaboração desta Dissertação.

Ao jovem FLÁVIO TÚLIO CÔRTEZ DOS SANTOS MACHADO, pela excelente editoração eletrônica desta Dissertação.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO . . . . .	1
2. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	8
2.1. Plantéis de Reprodutores, Estocagem e Alimentação . . . . .	8
2.2. Captura, Seleção e Marcação . . . . .	9
2.3. Soluções e suas Aplicações . . . . .	11
2.4. Biópsia . . . . .	13
2.5. Extrusão, Fecundação e Incubação . . . . .	14
2.6. Análises Estatísticas . . . . .	16
3. RESULTADOS . . . . .	17
3.1. Etapa do Experimento na UPG . . . . .	17
3.1.1. Migração de Núcleo dos Ovócitos . . . . .	17
3.1.1.1 Análise Estatística . . . . .	19
3.1.2. Desova . . . . .	19
3.1.3. Fecundação . . . . .	20
3.2. Etapa do Experimento no CEPTA . . . . .	20

3.2.1. Migração de Núcleo dos Ovócitos . . . . .	21
3.2.1.1. Análise Estatística . . . . .	22
3.2.2. Diâmetro dos Ovócitos . . . . .	23
3.2.2.1. Análise Estatística . . . . .	23
3.2.3. Desova . . . . .	24
3.2.4. Fecundação . . . . .	24
4. DISCUSSÃO . . . . .	25
4.1. Etapa do Experimento na UPG . . . . .	28
4.1.1. Maturação Ovocitária . . . . .	28
4.1.2. Desova e Fecundação . . . . .	30
4.2. Etapa do Experimento no CEPTA . . . . .	32
4.2.1. Maturação Ovocitária . . . . .	32
4.2.2. Desova e Fecundação . . . . .	33
4.2.3. Diâmetro dos Ovócitos . . . . .	35
4.3. Comparação dos Resultados da UPG e do CEPTA . . . . .	36
4.3.1. Fatores Abióticos . . . . .	36
4.3.2. Tratamentos, Maturação Ovocitária Final e Desova . . . . .	38
5. RESUMO E CONCLUSÕES . . . . .	43
6. TABELAS, FIGURAS E APÊNDICES . . . . .	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	73

## ABREVIATURAS DE EXPRESSÕES E TERMOS ENCONTRADOS NESTA DISSERTAÇÃO

CEPTA	Centro de Pesquisa e Treinamento em Aqüicultura;
CODEVASF	Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco;
cGtH	Gonadotrofina purificada de hipófise de carpa comum;
DA	Dopamina;
DOCA	Acetato desoxicorticosteróide;
DOM	Domperidona;
EHC	Extrato bruto de hipófise de carpa comum;
FSH	Hormônio folículo-estimulante;
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina;
GnRH-A	Análogo de hormônio liberador de gonadotrofina;
GRIF	Fator inibidor de liberação de gonadotrofina;
GtH	Hormônio gonadotrófico;
HCG	Gonadotrofina coriônica humana;
H-G	Horas-grau;
HRF	Nome comercial do produto utilizado como fonte de LHRH neste experimento, fabricado pelos Laboratórios Ayerst Ltda;

IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis;
IGS	Índice gônado-somático;
LHRH	Hormônio liberador de hormônio luteinizante;
LHRH-A	Análogo de Hormônio liberador de hormônio luteinizante;
MNR	Membrana nuclear rompida, não dando mais para distinguir a presença do núcleo do ovócito ( = GVBD - "Germinal vesicle breakdown");
NC	Núcleo germinal situado na região central do ovócito;
NM	Núcleo germinal migrando para a periferia, mas sem atingir a membrana do ovócito;
NP	Núcleo germinal na periferia do ovócito, tocando em sua membrana;
PB	Proteína bruta;
PIM	Pimozida;
PSMG	Gonadotrofina de sêro de égua prenhe;
SF	Solução fisiológica, a 0,65% de NaCl;
SG-G100	Gonadotrofina parcialmente purificada de hipófise de salmão;
SV	Solução veículo, a 0,7% de NaCl e 0,1% de metabissulfito de sódio;
UPG	Unidade de Piscicultura do Gorutuba;

## 1. INTRODUÇÃO

A conservação de estoques naturais e de locais de desova, juntamente com a propagação artificial, são as únicas formas de se produzir peixes visando a preservação das espécies e a produção de pescado em alta escala, fazendo face ao crescente consumo decorrente do aumento da população mundial. O oceanógrafo JACQUES-YVES COUSTEAU disse recentemente, durante a conferência da Organização das Nações Unidas sobre meio ambiente e desenvolvimento realizada no Rio de Janeiro, a Eco 92, que "os oceanos estão exauridos" (*REVISTA VEJA* - Ed. 1239 de 17/06/92). A pesca predatória e o aumento do esforço de pesca estão reduzindo drasticamente os estoques pesqueiros de ambientes naturais, sejam eles mares ou rios.

A busca por alternativas de produção de pescado, em contrapartida ao aumento da demanda, é uma constante. Muitas espécies de peixe de alto valor comercial ou de importância para os ambientes naturais não se reproduzem espontaneamente em cativeiro, onde as condições não são favoráveis, sejam à maturação gonadal, sejam à desova (DONALDSON & HUNTER, 1983). Neste aspecto, desde o início dos trabalhos de HOUSSAY e VON IHERING por volta dos anos 30 (CASTAGNOLLI & TONIOLO, 1980; CASTAGNOLLI & CYRINO, 1980; HARVEY & HOAR, 1980) até os dias de hoje, novas técnicas de indução à maturação ovocitária, ovulação e desova têm sido pesquisadas em todo o mundo.

Na reprodução de peixes teleósteos, há uma interrelação entre hipotálamo, glândula pituitária e gônadas sexuais (DONALDSON & HUNTER, 1983). Nos primeiros estudos sobre propagação artificial de peixes realizadas por IHERING, CARDOSO, AZEVEDO e outros, eram feitas intervenções no eixo hipófise-gônada, processo este conhecido como hipofisação, que trata da indução da desova e espermição pela aplicação de extrato de pituitária contendo hormônio gonadotrófico em fêmeas e machos preparados (IHERING & ZEVEDO, 1936; AZEVEDO & CANALE, 1938; CASTAGNOLLI & TONIOLO, 1980; DONALDSON & HUNTER, 1983). Este hormônio atua sobre as gônadas estimulando a produção de esteróides sexuais necessários à maturação dos gametas e sua consequente liberação (JALABERT & FOSTIER, 1984; GURAYA, 1986). A técnica da hipofisação manteve-se praticamente única na propagação artificial de peixes até o início da década de 70 (DONALDSON & HUNTER, 1983), se bem que tenha havido aperfeiçoamento de seu uso ao longo do tempo, mas ainda hoje ela é empregada na maioria das desovas induzidas de peixes em vários países.

Embora a utilização de pituitárias de teleósteos na indução à reprodução de peixes venha sendo feita com relativa eficiência há mais de meio século, justifica-se a realização de novas pesquisas visando a busca por produtos que preencham requisitos, tais como: eficácia reprodutiva, teores hormonais conhecidos, facilidades de obtenção e aplicação e preços competitivos. DONALDSON & HUNTER (1983) embora admitindo que outros hormônios, além do GtH existente na pituitária, possam proporcionar efeito sinérgico sobre a indução à desova, afirmam, também, que o peixe receptor pode desenvolver regiões imunes à gonadotrofina ou a outra proteína existente na pituitária heteroplástica aplicada. CRIM *et al.* (1983a) também sugerem que o uso de extrato de hipófise em espécie diferente, além de ser em diversas ocasiões de difícil obtenção, nem sempre proporciona resultados seguros e pode provocar a formação de anticorpos aos hormônios hipofisários exógenos. BILLARD *et al.* (1987) afirmam que, além das limitações para sua obtenção, os extratos de pituitária possuem atividade biológica desconhecida. A qualidade da hipófise está relacionada com o peixe doador,

a época da coleta, a forma e o tempo de conservação (JALABERT *et al.*, 1977). A falta de constância no peso e na concentração de gonadotrofina entre pituitárias, bem como dificuldades em sua obtenção têm limitado a realização de muitas reproduções em estações de piscicultura em todo o mundo, particularmente no Brasil. As capturas de cardumes de *Prochilodus lineatus* realizadas nos rios Cuiabá (Mato Grosso) e Miranda (Mato Grosso do Sul), entre setembro de 1987 e outubro de 1988, para formação de banco de hipófises no Centro de Pesquisas e Treinamento em Aquicultura - CEPTA, onde só naquele período foram coletadas quase 70.000 unidades (ALCÂNTARA ROCHA *et al.*, 1989), são exemplos das dificuldades e dos custos que implicam as obtenções de glândulas pituitárias.

A partir dos anos 70, conseguiram-se obter resultados satisfatórios com outros produtos na elevação de GtH no sangue e na obtenção de desova em diversas espécies de peixes, passando-se a atuar, também, no eixo hipotálamo-hipófise (BRETON *et al.*, 1971, e BRETON & WEIL, 1973, citados por PETER, 1983; DONALDSON & HUNTER, 1983). Dentre estes produtos destacam-se, principalmente: gonadotrofina parcialmente purificada de pituitária de peixes teleósteos, como exemplo a SG-G100 - gonadotrofina parcialmente purificada de salmão - e cGtH - gonadotrofina purificada de carpa comum (YAMAZAKI & DONALDSON, 1968; GABILAN *et al.*, 1986; ZANUY & CARRILLO, 1987); gonadotrofina coriônica humana - HCG (GODINHO *et al.*, 1977; NATH & SUNDARARAJ, 1981; EPLER *et al.*, 1986; LEE *et al.*, 1988); hormônio liberador de hormônio luteinizante - LHRH (CHAN, 1977; CRIM *et al.*, 1981, 1983a,b; BILLARD *et al.*, 1984; CURY & TSUKAMOTO, 1988) e seus análogos (DONALDSON *et al.*, 1981/1982; LIN *et al.*, 1986; CRIM *et al.*, 1986); análogos de hormônio liberador de gonadotrofina - GnRH-A (BRETON *et al.*, 1983; SHERWOOD *et al.*, 1984, 1988; MACKENZIE *et al.*, 1984; RIBEIRO *et al.*, 1986; LIN *et al.*, 1988, 1991; ALMENDRAS *et al.*, 1988; BIENIARZ *et al.*, 1989); associações dos hormônios acima citados com antagonistas de dopamina, como a Domperidona, a Pimozida e a Metoclopramida (BILLARD *et al.*, 1987; FERRAZ DE LIMA *et al.*, 1988; LIN *et al.*, 1988, 1991;

GLUBOKOV *et al.*, 1992); esteróides, anti-estrógenos e cálcio (KUO & NASH, 1975; JALABERT *et al.*, 1977; BILLARD & PETER, 1977; UPADHYAYA & HAIDER, 1986; GARCIA, 1990; FELICI *et al.*, 1991; HALDER *et al.*, 1991); e, ainda, feromônios (FONTAINE, 1976; RESINK *et al.*, 1989; VAN WEERD *et al.*, 1990, 1991).

Como destaques dentre os novos produtos utilizados na indução da propagação artificial de peixes após a hipofiseação, têm-se o LHRH, por ter tornado realidade a intervenção no eixo hipotálamo-hipófise na reprodução de peixes, e o GnRH-A, por sua melhor qualidade em relação ao primeiro, uma vez que possui identidade estrutural mais próxima à do peixe mas, ao mesmo tempo, por sua maior potencia (ZANUY & CARRYLLO, 1987; LIN *et al.*, 1991). Além da importância do hormônio liberador de gonadotrofina, que induz a produção/liberação de GtH da hipófise para as gônadas, existe a influência de outros hormônios que estimulam ou inibem o processo de reprodução em animais: a presença de um fator inibidor de liberação de gonadotrofina (GRIF) tem sido relatada na literatura também para teleósteos, sendo este fator provavelmente a dopamina, que age diretamente sobre a hipófise dos peixes (BILLARD *et al.*, 1984; CHANG *et al.*, 1984; PETER *et al.*, 1986; LIN *et al.*, 1986, 1988; OMELJANIUK *et al.*, 1989). Pesquisas têm sido realizadas na busca por produtos que possam ser administrados aos peixes com a finalidade de se obter desovas pela potencialização dos LHRH-A e GnRH-A através do bloqueio dos receptores de dopamina na pituitária (OMELJANIUK *et al.*, 1989). Várias substâncias com efeito antagonista à dopamina já foram testadas em diversas espécies, dentre as quais se destacam: Domperidona (DOM), que foi empregada, entre outras espécies, em *Carassius auratus* (PETER *et al.*, 1986; OMELJANIUK *et al.*, 1989), em *Clarias gariepinus* (VAN ASSELT *et al.*, 1988), em *Piaractus mesopotamicus* (FERRAZ DE LIMA, 1988), em *Cyprinus carpio* (NANDEESHA *et al.*, 1990) e em *Paramisgurnus dabryanus* (LIN *et al.*, 1991); a Pimozida (PIM) foi utilizada em *Paramisgurnus dabryanus* (LIN *et al.*, 1986, 1991), em *Carassius auratus* (CHANG & PETER, 1983), em *Cyprinus carpio* (LIN *et al.*, 1988; BIENIARZ *et al.*, 1989) e em *Silurus*

*glanis* L. (EPLER & BIENIARZ, 1989); cloridrato de metoclopramida apresentou resultados satisfatórios em *Carassius auratus* (PETER *et al.*, 1986) e em *Salmo irideus* (GLUBOKOV *et al.*, 1992);  $\alpha$ -metil paratirozina ( $\alpha$ -MPT), que bloqueia a síntese de L-Dopa, foi utilizado em *Carassius auratus* (CHANG *et al.*, 1983; PETER *et al.*, 1986) e em *Paramisgurnus dabryanus* (LIN *et al.*, 1986); Reserpina (RES), que provoca a depleção de neurotransmissores de catecolaminas (GILMAN *et al.*, 1980, citados por CHANG *et al.*, 1983) foi utilizada em *Carassius auratus* (CHANG *et al.*, 1983, PETER *et al.*, 1986; LIN *et al.*, 1986) e em *Paramisgurnus dabryanus* (LIN *et al.*, 1986); Carbidopa (CBD), que impede a síntese de Dopamina a partir do L-Dopa (LIN *et al.*, 1986), foi empregado em *Carassius auratus* (PETER *et al.*, 1986) e em *Paramisgurnus dabryanus* (LIN *et al.*, 1986); 6- hidroxidopamina HCl (6-OHDA), que age destruindo os neurônios catecolaminérgicos (KOSTRZEWA & JACOBOWITZ, 1974, e ZAMBRANO, 1975 citados por CHANG *et al.*, 1983), foi utilizado em *Carassius auratus* (CHANG *et al.*, 1983; PETER *et al.*, 1986); Dietilditiocarbamate (DDC), que bloqueia a formação de neuroepinefrina a partir de Dopamina (LIN *et al.*, 1986), este não foi eficiente em *Carassius auratus* (CHANG *et al.*, 1983; PETER *et al.*, 1986), nem em *Paramisgurnus dabryanus* (LIN *et al.*, 1986).

A realização deste trabalho levou em consideração, dentre outros motivos: a) que quase 100% das propagações artificiais de peixes em estações de piscicultura do Brasil ainda são realizadas pela técnica da hipofisacção; b) que além da baixa disponibilidade (CURY & TSUKAMOTO, 1988; CAROLSFELD, 1989), boa parte do mercado de hipófises de peixes do país é abastecido por pituitárias importadas, com todas as dificuldades decorrentes de suas aquisições; c) no que diz respeito ao controle de qualidade do material utilizado (JALABERT *et al.*, 1977), ele é inexistente, tanto no caso das hipófises de peixes nacionais quanto das importadas; d) o alto preço do grama de hipófise (BILLARD *et al.*, 1987; CAROLSFELD, 1989), que hoje oscila em torno de US\$ 300,00/g no mercado brasileiro; e) os elevados custos que envolvem cada processo de desova induzida de peixes, desde a formação de plantéis de

reprodutores até sua utilização e f) pela maior procura por hipófises, em função da crescente demanda por alevinos verificada atualmente, decorrente da expansão das áreas de produção de pescado em propriedades rurais no Brasil.

Contando com a possibilidade do LHRH ser produzido em nível comercial e a preços competitivos em relação a outros produtos utilizados nas propagações induzidas de peixes (CRIM *et al.*, 1983b) e pelos resultados satisfatórios enumerados anteriormente, as perspectivas para sua utilização em alta escala nas estações de piscicultura, como alternativa de substituição do processo de hipofiseação, são bastante promissoras. Como no Brasil não são produzidos análogos estruturais do LHRH e do GnRH e tendo em vista que se buscava produtos de fácil obtenção, optou-se pelo emprego do LHRH disponível em drogarias do país, vendido comercialmente como HRF (Gonadorrelina), dos Laboratórios Ayerst Ltda. CURY & TSUKAMOTO (1988) realizaram observações de campo com este produto e obtiveram resultados satisfatórios com o *Piaractus mesopotamicus*.

Uma vez que não se dispunha de análogos mais potentes que o LHRH comum, agiu-se, também, na tentativa de se amenizar o efeito do fator inibidor de liberação de gonadotrofina (GRIF) através do uso de antagonista de dopamina, como forma de se potencializar o emprego do LHRH, como fizeram PETER *et al.* (1986) em *Carassius auratus*, FERRAZ DE LIMA (1988) em *Piaractus mesopotamicus* e NANDEESHA *et al.* (1990) com *Cyprinus carpio*, embora estes pesquisadores tenham empregado o GnRH-A ou o LHRH-A. No mercado nacional encontram-se drogas com efeito antagonista à dopamina, onde entre elas destacam-se algumas que já foram utilizadas com sucesso em desovas de peixes, como a domperidona, vendida comercialmente como Motilium (Janssen Farmacêutica Ltda.) (OMELJANIUK *et al.*, 1989; LIN *et al.*, 1991), que foi empregada nesta pesquisa, e o cloridrato de metoclopramida, vendido como Plasil (Merrell Lepetit Farmacêutica Ltda.) (PETER *et al.*, 1986; GLUBOKOV *et al.*, 1992).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), utilizado nesta pesquisa, é uma importante espécie de peixe da bacia do Prata, com ocorrência nos rios Paraná e Paraguai (CASTAGNOLLI & ZUIM, 1985; GODINHO & GODINHO, 1986). De expressivo valor comercial e com excelentes perspectivas para sua utilização na piscicultura comercial (CHABALIN *et al.*, 1988; ROMAGOSA *et al.*, 1990; TORLONI *et al.*, 1991), vem sendo exaustivamente estudado, em áreas tão abrangentes como na sistemática (BRITSKI, 1977; GÉRY, 1986), nutrição e cultivo (CANTELMO & SOUZA, 1988; CHABALIN & FERRAZ DE LIMA, 1988; BERNARDINO & FERRARI, 1989; MENTON, 1989; TORLONI *et al.*, 1991), morfologia e reprodução (GODINHO *et al.*, 1977; FERRAZ DE LIMA *et al.*, 1984, 1988; ROMAGOSA *et al.*, 1985, 1988, 1990; ROMAGOSA, 1991; GODINHO & GODINHO, 1986, 1988; ALVES & GODINHO, 1987; CAROLSFELD *et al.*, 1988, 1990; CURY & TSUKAMOTO, 1988; LIMA *et al.*, 1991), enfermidades (CECCARELLI, 1988; CONROY, 1989) e genética (ALMEIDA TOLEDO *et al.*, 1988). Muitos trabalhos com pacu na área de reprodução com a utilização de LHRH, LHRH-A e GnRH-A foram realizados com relativo sucesso. CURY & TSUKAMOTO (1988) testaram o LHRH, RIBEIRO *et al.* (1986), ROSA *et al.* (1986) e CAROLSFELD *et al.* (1988) utilizaram o LHRH-A e FERRAZ DE LIMA *et al.* (1988) empregaram o sGnRH-A. A domperidona, como antagonista do receptor de dopamina, também já foi utilizada em pacu por FERRAZ DE LIMA *et al.* (1988), associada ao sGnRH-A, que formam um só produto, vendido no mercado internacional como "Ovaprim", dos laboratórios Syndel.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Plantéis de Reprodutores, Estocagem e Alimentação

Foram utilizados 2 plantéis de reprodutores de pacu (*P. mesopotamicus*), sendo que um deles estava estocado na Unidade de Piscicultura do Gorutuba - UPG, da Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco - CODEVASF, localizada no município de Porteirinha, MG (15° 43' S e 43° 15' W), e o outro era mantido no Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura - CEPTA, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, situado no município de Pirassununga, SP (22° 02' S e 47° 30' W).

O plantel da UPG, com 61 exemplares, era mantido num viveiro de terra de 1000 m, numa densidade média de 1 kg/6,3 m. Em meados do mês de outubro/89, o plantel foi transferido para 4 viveiros com laterais em alvenaria e fundo de terra, com 200m cada, ficando ali numa densidade média de estocagem de 1 kg/4,6m com peso médio corporal de 2,85 kg. O plantel da UPG foi mantido sob condições de fotoperíodo natural e com temperatura da água variando de 22 °C em junho a 27 °C, no mês de novembro/89. Enquanto isto, o plantel do CEPTA utilizado neste experimento, num total de 264 exemplares e cujo peso médio do exemplar era de 1,75 kg, estava estocado em 2 viveiros de terra de 1.000 m cada, divididos ao meio por uma tela, numa densidade média de estocagem de 1 kg/ 4,33 m, submetidos às

condições naturais de fotoperíodo e com temperatura média da água variando de 17,5 °C em junho a 27 °C, em dezembro/89.

Considerando que, estudos realizados no CEPTA (FERRAZ DE LIMA, 1989) sugeriam que, para reprodutores de pacu, ração contendo 30% de proteína bruta (PB) atendia aos seus requisitos nutricionais, forneceram-se aos 2 plantéis rações que apresentassem níveis de PB próximos daquele referencial. Os pacus da UPG vinham recebendo ração balanceada com aproximadamente 22% de PB até o mês de julho/89, com taxa de alimentação em cerca de 3% da biomassa total, diariamente, e passaram a ser alimentados a partir daquele mês com ração balanceada peletizada contendo 32,3% de PB, conforme análises bromatológicas realizadas no CEPTA. O arraçoamento, equivalente a 2,5% da biomassa total por dia, era dividido em 2 etapas, sendo a primeira por volta das 9:00 horas e a segunda, em torno das 16:00 horas. Já os pacus do CEPTA, utilizados neste experimento, faziam parte de outro teste e obedeciam a esquema um pouco diferente no que diz respeito à alimentação, que compreendia um fornecimento diário de ração balanceada contendo 32% de PB e que era administrada *ad libitum*, em uma única refeição diária, por volta das 9:00 horas, em 6 dias por semana.

## 2.2. Captura, Seleção e Marcação

As capturas dos reprodutores nos viveiros eram realizadas sempre pela manhã, entre 8 e 10 horas, por meio de redes de arrasto de náilon multifilamento, com malha de 25 mm entre nós opostos. As seleções dos exemplares para indução eram efetivadas com os peixes ainda no interior dos viveiros (LIN *et al.*, 1986; CAROLSFELD *et al.*, 1988; FERRAZ DE LIMA *et al.*, 1988). Procurou-se identificar as fêmeas que apresentassem aspectos externos favoráveis à desova (FERRAZ DE LIMA *et al.*, 1988; ROMAGOSA *et al.* 1990). Foram selecionados, por repetição, 3 fêmeas e 4 machos na UPG e 4 fêmeas e 5 machos no CEPTA, de um total de 5 repetições (ou blocos) em cada um dos 2 locais (TAB. 1 e 2).

Tendo em vista o curto prazo para a execução do experimento, trabalhou-se na UPG, de cada vez, com duas, duas e uma repetições a partir dos dias 27, 28 e 30/11/89, respectivamente, e no CEPTA também com duas, duas e uma repetições começando nos dias 7, 8 e 12/12/89.

Procurou-se, na medida do possível, realizar a captura, a seleção e o transporte dos exemplares com o cuidado necessário para reduzir o estresse decorrente do manejo (JALABERT *et al.*, 1977).

Ao chegar ao pavilhão de reprodução, as fêmeas foram pesadas e marcadas com etiquetas plásticas numeradas, sendo estas fixadas na membrana entre os raios da nadadeira dorsal por meio de linhas náilon. Em seguida foi feito sorteio, visando tornar aleatória a definição de uso das soluções a serem testadas (EHC+SF, LHRH+SF, LHRH+SF+DOM+SV e SF). Confeccionou-se um protocolo de acompanhamento (APÊNDICE A) para todo o processo de indução, para anotações dos pesos corporais de machos e fêmeas selecionadas e de suas marcas, tamanho e número de doses das soluções ministradas, hora de aplicação de cada solução, temperatura da água e evolução das horas-grau, peso da ova coletada e taxa de fecundação por incubadora.

Para os machos, dos dois locais dos experimentos, tomou-se como critério de seleção apenas a liberação positiva do sêmen com adequada viscosidade, após leve pressão no abdômem (HARVEY & HOAR, 1980; ROMAGOSA *et al.*, 1990). Em seguida, eles foram transportados para o pavilhão de reprodução, pesados e colocados em tanques diferentes dos que se encontravam as fêmeas. Estes tanques eram dotados de renovação constante de água, numa vazão aproximada de 25 litros por minuto. Os tanques da UPG são de alvenaria, com capacidade para 3600 litros, enquanto os do CEPTA são de fibra de vidro e comportam 3000 litros cada. O volume d'água utilizado foi, aproximadamente, o da metade de suas respectivas capacidades máximas.

Considerando-se que os pacus eram razoavelmente "domesticados", não se fez uso de tranquilizantes nas fases anteriormente descritas. Entretanto, para as biópsias e extrusões, utilizaram-se cerca de 10 ppm de Quinaldina (C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N), (Merck)(WOYNAROVICH, 1986) em caixas de 100 e 60 litros onde, após colocados os peixes, aguardavam-se 3 a 5 minutos para o início do manuseio.

### 2.3. Soluções e suas Aplicações

Utilizaram-se as seguintes soluções: a) LHRH dissolvido em solução fisiológica (SF), doravante representado apenas por LHRH; b) LHRH em solução fisiológica e Domperidona (DOM) em solução veículo (SV), que passarão a ser indicados como LHRH+DOM; c) extrato bruto de hipófise de carpa comum dessecada em acetona dissolvido em solução fisiológica como controle positivo, que doravante chamar-se-á simplesmente de EHC; e d) solução fisiológica, também como controle, indicada a seguir como SF.

O LHRH utilizado neste experimento, vendido comercialmente no Brasil em frasco-ampola com 0,5 mg com o nome de HRF (Gonadorrelina), do Laboratório Ayerst Ltda., possui a mesma identidade estrutural e biológica do hormônio natural de liberação de LH-FSH de mamíferos, conforme seus fabricantes. O LHRH foi dissolvido, imediatamente antes de seu uso, em solução fisiológica a 0,65% de NaCl (VAN DER KRAAK *et al.*, 1986).

Como Domperidona (DOM) empregou-se a droga disponível no mercado sob a denominação de Motilium (Janssen Farmacêutica Ltda), que é apresentada em frasco contendo 15 ml de suspensão, na concentração de 10 mg de DOM/ml. A DOM foi diluída numa solução veículo (SV) a 0,7% de NaCl e 0,1% de metabissulfito de sódio (SOKOLOWSKA *et al.*, 1984; LIN *et al.*, 1988), e aplicada em 0,5 e 1 ml/kg de pacu, respectivamente, nas primeiras e segundas doses, ministradas imediatamente após as aplicações de LHRH em solução

fisiológica.

As hipofisizações (IHERING & AZEVEDO, 1936, 1981; FONTENELE, 1953, 1982; e SILVA *et al.*, 1981), foram consideradas neste trabalho como controle positivo, por apresentarem resultados satisfatórios no pacu (GODINHO & GODINHO, 1986; SILVA FILHO, 1986; BERNARDINO *et al.*, 1988). Elas foram realizadas na UPG e no CEPTA com o uso de hipófise seca de carpa comum (EHC), *Cyprinus carpio* L., com peso médio de 2,8 mg, que foi dissolvida em solução fisiológica (SF) a 0,65% de NaCl.

A solução fisiológica (SF), sozinha, também foi empregada num grupo de fêmeas controle (BILLARD *et al.*, 1984; LIN *et al.*, 1986) do CEPTA, na dosagem de 0,5 ml/kg à 1ª dose e de 1 ml/kg à 2ª dose. Em virtude da UPG apresentar plantel pequeno, eliminou-se o tratamento em que era fornecido apenas o SF, de forma a não reduzir a qualidade da seleção dos reprodutores.

As soluções (EHC+SF, LHRH+SF, LHRH+SF+DOM+SV e SF) foram aplicados intraperitonealmente (VAN ASSELT *et al.*, 1988) próximo à base da nadadeira ventral, através de seringas graduadas de 5 e 10 ml. Conforme os protocolos de acompanhamento (APÊNDICE A) e de aplicação (TAB. 1 e 2), as doses foram divididas em 2 injeções (HARVEY & HOAR, 1980; PETER, 1980; CAROLSFELD *et al.*, 1988), sendo a primeira considerada como "preparatória" e a segunda como "decisiva" (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983; BILLARD *et al.*, 1984). O EHC foi fornecido, respectivamente, em 0,5 e 5 mg/kg (GODINHO & GODINHO, 1986), o LHRH foi ministrado em 50 e 100 µg/kg (CURY & TSUKAMOTO, 1988) e a DOM foi aplicada no total de 10 mg/kg (LIN *et al.*, 1988) que foi dividida em 3,5 e 6,5 mg/kg, para acompanhar aproximadamente a mesma proporção das doses de LHRH.

Os machos receberam, sem distinção, a aplicação de 0,5 mg de EHC por kg de peso corporal na 1ª dose, logo após a dose inicial ministrada às fêmeas, e 2,5 mg de EHC/kg na 2ª

dose (SILVA & PINHEIRO, 1989), também injetada em seguida à dose decisiva fornecida às fêmeas. Todas as doses para os machos foram igualmente aplicadas na cavidade peritoneal, tendo como veículo o SF em 0,5 ml/kg na 1ª dose e 1,0 ml/kg na 2ª dose.

#### 2.4. Biópsia

Com a finalidade de se determinar o nível de maturação ovocitária nos dois experimentos, foram efetuadas três biópsias em cada matriz. A primeira ocorreu imediatamente antes da aplicação da dose inicial de cada solução que estava sendo testada (BILLARD *et al.*, 1984), a segunda antecedeu a dose decisiva, com cerca de 12 a 13 horas após a dose preparatória, e a terceira biópsia foi realizada no momento previsto para atingir 300 horas-grau após a dose decisiva, ou antes, caso já houvesse ocorrido extrusão em função de manifestados movimentos ovulatórios das fêmeas (WOYNAROVICH, 1986).

Para as biópsias, tomou-se por base a técnica de punção abdominal (BIENIARZ & EPLER, 1976), com agulha 40x20, que foi conectada a uma seringa de vidro de 5 ml através de uma sonda plástica transparente de 5 cm. A agulha foi inserida através da parede abdominal entre a base da nadadeira ventral e a linha lateral, numa profundidade de 1,5 a 3 cm, de onde se retirava uma porção estimada em mais de 200 ovócitos. Estes foram colocados em frasco de vidro de 10 ml devidamente etiquetado, contendo solução fixadora (solução salina a 0,6% e formalina a 1%: SHEHADEH *et al.*, 1973).

De 0,5 a 2 horas depois da coleta e imediatamente após clareados com solução de Serra (60% de álcool absoluto, 30% de formol a 40% e 10% de ácido acético glacial)(BILLARD, 1979), pelo menos 100 ovócitos por fêmea foram examinados ao microscópio estereoscópico e classificados tomando-se por base a escala proposta por BILLARD *et al.* (1984), anotando-se a ocorrência dos seguintes ítems: a) NC - núcleo situado na região central do ovócito; b) NM

- núcleo migrando para a periferia, mas sem atingir a membrana do ovócito; c) NP - núcleo na periferia do ovócito, tocando em sua membrana; e d) MNR - membrana nuclear rompida, não dando mais para distinguir a presença do núcleo. A partir das biópsias e de suas análises, tomou-se como critério para caracterizar a condição de ovócitos maduros aqueles que apresentaram a membrana nuclear rompida - MNR (JALABERT, 1976; BILLARD, 1979; GOETZ, 1983; MATSUYAMA *et al.*, 1988).

Nos testes realizados no CEPTA tomou-se, também, o diâmetro destes ovócitos, com o emprego de microscópio estereoscópico com ocular micrométrica. Os dados obtidos nas análises dos produtos das biópsias por fêmea, como posição do núcleo e diâmetro do ovócito foram lançados em formulários próprios (APÊNDICE B).

## 2.5. Extrusão, Fecundação e Incubação

De hora em hora, a partir do início dos trabalhos de indução, foi tomada a temperatura da água dos tanques do pavilhão de reprodução onde foram mantidas as matrizes, com o fim de se precisar o momento em que se atingiria 300 horas-grau (h-g) contadas a começar da 2ª dose, quando deveria ser realizada a 3ª biópsia e/ou a primeira tentativa de extrusão. Tomaram-se 300 h-g como valor intermediário entre os resultados obtidos com reprodução induzida de pacu por GODINHO & GODINHO (1986), SILVA FILHO (1986), BERNARDINO *et al.* (1988), CURY & TSUKAMOTO (1988) e FERRAZ DE LIMA *et al.* (1988). Entretanto, foi acompanhado o comportamento das fêmeas a partir de 250 h-g, aproximadamente, com a finalidade de se verificar a ocorrência de possíveis movimentos ovulatórios (WOYNAROVICH, 1986), o que determinaria a antecipação dos procedimentos de coleta de ovos, através da 3ª biópsia e da extrusão.

Completadas 300 h-g, cada fêmea era capturada e, após ser realizada a 3ª biópsia,

exercia-se leve pressão no seu abdômen com o objetivo de se obter a liberação de ovos na forma livre (HARVEY & HOAR, 1980; LIN *et al.*, 1988). Caso não ocorresse a extrusão dos ovos naquela primeira oportunidade, aguardava-se aproximadamente 15 h-g para uma segunda tentativa, sendo repetida aquela operação enquanto não ocorresse a liberação dos ovos na forma livre, até cerca de 420 h-g, quando era dada por encerrada cada seção de repetição do experimento. Os ovos (WALLACE & SELMAN, 1981) extrusados eram coletados em bacias plásticas, devidamente taradas e etiquetadas e pesados antes de receberem o sêmen.

A fertilização dos ovos foi feita "a seco" (IHERING & AZEVEDO 1981; WOYNAROVICH, 1986). Utilizou-se gametas de mais de um macho por bacia, de forma a reduzir a influência da qualidade do sêmen de diferentes machos sobre o índice de fecundação dos ovos de distintas fêmeas.

Empregou-se como critério para caracterizar a desova, as fêmeas que liberassem ovos livres (CAROLSFELD *et al.*, 1988) e que eles viessem a se hidratar quando já estivessem imersos n'água (TAMARU *et al.*, 1988) alguns instantes depois.

Antes de serem levados à incubação, ocorreram repetidas trocas da água das bacias, como procedimento de lavagem dos ovos fecundados (IHERING & AZEVEDO, 1981).

Os ovos hidratados foram colocados, cerca de 20 a 30 minutos após a extrusão, em incubadoras de fibra de vidro tipo funil (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983) com capacidade para 60 l d'água, na UPG, e em incubadoras de 20 e 200 l, no CEPTA, na proporção de, aproximadamente, 2 g de ovos por litro d'água para as incubadoras de 20 l e 1,5 g de ovos por litro d'água para incubadoras de 60 e 200 l. A renovação da água nas incubadoras foi feita de maneira constante próxima a 0,5, 1 e 1,5 l/min, respectivamente para as incubadoras de 20, 60 e 200 l. Após 12 horas, a vazão era aumentada gradativamente até atingir, respectivamente, algo em torno de 1,5, 3,0 e 4,5 l/min.

Após 9 a 10 horas da fertilização dos ovos e já na fase da embriogênese, indicada pelo fechamento do blastóporo (ALVES & GODINHO, 1987), foram realizadas amostragens de ovos em cada incubadora, para se determinar o índice de fecundação por fêmea (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983).

## 2.6. Análises Estatísticas

Foram realizados testes estatísticos visando determinar comparativamente a eficácia das soluções (EHC + SF, LHRH + SF, LHRH + SF + DOM + SV e SF) na maturação ovocitária e na desova das fêmeas de pacu.

Para cada um dos dois plantéis utilizou-se delineamento em blocos completos casualizados, em que cada fêmea foi considerada unidade experimental (GOMES, 1977). Os dados em porcentagem de ovócitos maduros, ou seja, com membrana nuclear rompida (MNR), foram submetidos à transformação angular conforme ARRUDA (1979).

Foram empregadas análises de variância para experimento bifatorial (preparados e biópsias) (SOKAL & ROHLF, 1979) com o objetivo de verificar a existência de diferença significativa, ao nível de 5%, no atingimento da maturação ovocitária pelas fêmeas e no diâmetro dos ovócitos de fêmeas submetidas às soluções. As comparações de médias foram feitas com o teste SNK (STEEL & TORRIE, 1980).

A desova das fêmeas submetidas às diversas soluções foi comparada pelo emprego do teste exato de Fisher (CAMPOS, 1983; LIN *et al.*, 1986).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Etapa do Experimento na UPG**

Na captura dos exemplares de pacu da Unidade de Piscicultura do Gorutuba - UPG, verificou-se que, desde o primeiro grupo selecionado, as fêmeas ainda não se encontravam com aspectos externos que pudessem ser considerados satisfatórios para o início dos trabalhos de indução artificial à desova. As matrizes denotavam características de fêmeas que se apresentavam em fase de preparação das gônadas para desova, como ventre pouco abaulado e pouco flácido.

##### **3.1.1. Migração de Núcleo dos Ovócitos**

Verificou-se no experimento realizado na UPG, que as fêmeas do 1º bloco apresentaram, à primeira biópsia, incidência média superior a 60% de ovócitos com núcleo na posição central (NC) e menos de 40% com núcleo em migração para a periferia do ovócito (NM) sem, contudo, ter ocorrido caso de ovócito com o núcleo tocando sua membrana (NP), conforme pode ser constatado na FIG. 1. A medida que as soluções (EHC, LHRH e LHRH+DOM) foram sendo aplicadas, houve acentuado declínio na percentagem de ovócitos com NC e elevação daqueles com a membrana nuclear rompida (MNR), embora a média destes últimos tenha ficado apenas em torno dos 60% quando da 3ª biópsia. Somente a fêmea que

recebeu LHRH atingiu mais de 77% de ovócitos com membrana nuclear rompida (MNR).

No 2º bloco, repetiu-se a tendência observada no 1º, mas o percentual de ovócitos com NC, à 1ª biópsia, foi mais acentuado (aproximadamente 70%) e somente à 3ª biópsia ocorreram ovócitos com MNR. Mais uma vez, o tratamento à base de LHRH apresentou melhor performance em relação ao atingimento da condição de ovócitos maduros (MNR), tendo totalizado 64% dos ovócitos amostrados.

No 3º bloco, percebeu-se diferença em relação aos dois blocos iniciais, pois já na seleção das fêmeas verificou-se que estas estavam melhor preparadas, embora que à primeira biópsia tenha ocorrido a tendência observada nos dois primeiros blocos, isto é, alto índice de ovócitos com NC (acima de 68%), estando o restante com NM. À 3ª biópsia, entretanto, foi evidente o amadurecimento dos ovócitos, atingindo, em média, acima de 90% dos ovócitos amostrados (FIG. 2), com diferença mínima entre os três tratamentos e leve superioridade para a fêmea que recebeu EHC.

O 4º bloco apresentou praticamente as mesmas tendências do bloco anterior, no qual percebeu-se que as fêmeas estavam melhor preparadas para a indução à desova. Na 3ª biópsia, as fêmeas chegaram a atingir, em média, quase 96% dos ovócitos com MNR e menor diferença entre as 3 soluções.

Tanto no 3º bloco quanto no 4º bloco, observou-se que a passagem de ovócitos com NM para MNR se dava após a aplicação da dose decisiva (2ª dose), entre as 2ªs e 3ªs biópsias, uma vez que foi verificado baixo índice de ovócitos com NP nas duas primeiras biópsias realizadas em cada fêmea (FIG. 2).

No 5º bloco, confirmou-se a tendência verificada nos blocos 3 e 4, em que as fêmeas atingiram melhor condição para a desova, apresentando-se com o ventre mais abaulado,

facilitando consideravelmente o trabalho de seleção. Já na 1ª biópsia ocorreu inversão na incidência de ovócitos com NC e NM, atingindo este último quase 60%. A média de ovócitos com MNR à 3ª biópsia do 5º bloco foi superior a 92%, destacando-se a fêmea do tratamento à base de EHC que registrou 100% de ovócitos maduros.

A TAB. 3 e a FIG. 3 apresentam os dados agrupados dos 5 blocos do experimento realizado na UPG, nas quais se verifica elevado índice de ovócitos com NC à 1ª biópsia, atingindo níveis baixos à 3ª biópsia, e um percentual nulo de ovócitos com MNR à 1ª biópsia, contra alto índice à 3ª biópsia.

#### 3.1.1.1 Análise Estatística

A análise de variância para experimento bifatorial (TAB. 10) mostrou que, não existiu diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre os efeitos da aplicação das soluções (EHC, LHRH e LHRH + DOM) na obtenção de ovócitos com MNR. Houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre pelo menos uma biópsia do experimento, no que diz respeito à obtenção de ovócitos com MNR. Não existiu diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre as interações soluções versus biópsias, no que se refere à ocorrência de ovócitos com MNR.

A comparação entre biópsias através do teste SNK, não apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias obtidas nas 1ª e 2ª biópsias, relativas à ocorrência de ovócitos com MNR, mas foi significativa a diferença registrada entre aquelas e a média obtida à 3ª biópsia.

#### 3.1.2. Desova

No experimento levado a efeito na UPG, ocorreram várias desovas, conforme se observa

na TAB. 5. Com base no teste exato de Fisher, a probabilidade de fêmea submetida ao LHRH vir a desovar e o mesmo ocorrer com as tratadas com EHC é de 50%. A probabilidade de fêmea submetida ao tratamento com LHRH+DOM vir a desovar e o mesmo não ocorrer com aquela submetida ao EHC é de 91,7%. A probabilidade de fêmea submetida ao tratamento com LRHR+DOM vir a desovar e o mesmo não ocorrer com aquela submetida ao LHRH é de 77,8%.

### **3.1.3. Fecundação**

Todos os machos utilizados liberaram sêmen fluido suficientemente para a operação de fecundação dos ovos, que foram coletados em bacias plásticas, sendo a fertilização realizada a sêco.

Das 5 desovas obtidas em fêmeas tratadas com LHRH+DOM, 3 apresentaram taxas de fecundação variando de 6,6% a 81,2% (TAB. 5 e FIG. 6), com média de 39,1 38,2%, e as 2 outras apresentaram taxa de fertilização nula. Das que receberam LHRH, 3 desovaram de um total de 5 testadas, mas apenas numa os ovos foram fecundados, em 51,3%, enquanto as outras 2 tiveram taxa nula. Das fêmeas tratadas com EHC, 2 desovaram em 5 testadas, com uma apresentando taxa de fecundação de 4,4% e a outra nula.

## **3.2. Etapa do Experimento no CEPTA**

Na seleção das fêmeas de pacu do Centro de Pesquisas e Treinamento em Aquicultura - CEPTA, constatou-se que, aparentemente, estas já teriam ultrapassado a melhor fase para a reprodução induzida, com o ventre exageradamente flácido.

### 3.2.1. Migração de Núcleo dos Ovócitos

No 1º bloco do experimento no CEPTA, constatou-se, à 1ª biópsia, a presença de razoável percentual de ovócitos com núcleo periférico. Apenas a fêmea que recebeu EHC respondeu satisfatoriamente à indução, tendo apresentado 96% de ovócitos com MNR à 3ª biópsia (FIG. 4).

No 2º bloco, já à 1ª biópsia, constatou-se a ocorrência de ovócitos maduros (MNR). Mas, da mesma forma que no bloco anterior, apenas a fêmea que recebeu EHC mostrou altos valores de ovócitos com MNR (97%). As demais soluções não provocaram efeitos significativos.

No 3º bloco, registrou-se a mesma tendência dos blocos anteriores, cujas fêmeas denotaram características de maturação gonadal avançada, com os 4 exemplares apresentando ovócitos nos diferentes estádios maturacionais considerados nesta pesquisa, ou sejam, NC, NM, NP e MNR. Mais uma vez, somente a fêmea que recebeu EHC atingiu nível alto de ovócitos maduros (acima de 82%).

No 4º bloco, voltaram a ser registrados os resultados dos blocos anteriores que apresentaram, já à 1ª biópsia, ovócitos com MNR e no qual somente a fêmea que foi tratada com EHC apresentou amadurecimento quase total dos ovócitos amostrados (cerca de 96%).

No 5º bloco desta série de repetições, confirmou-se a tendência dos resultados obtidos nos blocos anteriores. Neste, as 4 fêmeas apresentaram ovócitos maduros já no início do tratamento (entre 4,1 e 23,4% de ovócitos com MNR) e que somente a fêmea que recebeu EHC atingiu percentual expressivo de ovócitos maduros no momento da 1ª extrusão, ocorrida imediatamente após a 3ª biópsia (97,5% com MNR).

A TAB. 4 e a FIG. 5 apresentam os dados agrupados das 5 repetições do experimento realizado no CEPTA. Percebe-se que, já na 1ª biópsia, ocorreram os 4 diferentes estádios de maturação ovocitária considerados nesta pesquisa (NC, NM, NP e MNR) e que somente a fêmea que foi tratada com EHC apresentou amadurecimento expressivo dos ovócitos à 3ª biópsia, atingindo percentual médio de  $93,7 \pm 6,5\%$  de ovócitos com MNR.

### 3.2.1.1. Análise Estatística

A análise de variância para experimento bifatorial (TAB. 11) revelou a existência de diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as reações manifestadas frente às soluções (EHC, LHRH, LHRH+DOM e SF) na obtenção de ovócitos maduros (com MNR), em, pelo menos, uma das fêmeas de pacu. Também foi significativa ( $p \leq 0,05$ ) a diferença entre as biópsias na obtenção de ovócitos maduros. Foi significativa a diferença ( $p \leq 0,05$ ) ao menos em um tratamento (interação solução x biópsia) no amadurecimento dos ovócitos.

Não existiu diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre os resultados obtidos pelas fêmeas tratadas com LHRH, LHRH+DOM e SF, no que diz respeito à obtenção de ovócitos com MNR. Entretanto, as percentagens de ovócitos com MNR de fêmeas tratadas com EHC foram significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) àquelas dos ovócitos das que receberam as demais soluções. Não ocorreu diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as frequências de ovócitos com MNR nas 2 primeiras biópsias das fêmeas tratadas com as 4 soluções. Contudo, à 3ª biópsia, ocorreu aumento significativo no número de ovócitos com MNR. Todos os tratamentos (interação solução x biópsia) foram idênticos entre si em relação à frequência de ocorrência de ovócitos com MNR, com exceção das fêmeas que receberam EHC, as quais, à 3ª biópsia, apresentaram percentuais destes ovócitos significativamente superiores aos dos demais tratamentos.

### 3.2.2. Diâmetro dos Ovócitos

Os diâmetros dos ovócitos, obtidos por biópsia ovariana, apresentaram variação de 750 a 1.250  $\mu\text{m}$ , à 1ª biópsia, com média de  $1.011,5 \pm 80,5 \mu\text{m}$  e coeficiente de variação (CV) de 8% e, à 3ª biópsia, a variação foi de 850 a 1.250  $\mu\text{m}$ , com média de  $1.071,2 \pm 70,8 \mu\text{m}$  com CV igual a 6,6% (TAB. 9 e FIG. 8).

As fêmeas que efetivamente desovaram e com ovos fecundados, que foram tratadas à base de EHC, apresentaram, à 1ª biópsia, ovócitos com diâmetro variando de 750 a 1.125  $\mu\text{m}$ , com média de  $985,5 \pm 88,5 \mu\text{m}$  e 9% de CV, à 2ª biópsia a variação oscilou entre 925 e 1.200  $\mu\text{m}$ , com média de  $1.072,5 \pm 64 \mu\text{m}$  e 6% de CV e, à 3ª biópsia, o diâmetro dos ovócitos oscilou entre 925 e 1.250  $\mu\text{m}$ , com média de  $1.129 \pm 67 \mu\text{m}$  e CV igual a 5,9%.

#### 3.2.2.1. Análise Estatística

Na análise de variância para experimento bifatorial, onde foi considerada a relação entre soluções e biópsias (TAB. 12), constatou-se que, embora tenha havido aumento no diâmetro dos ovócitos das fêmeas tratadas com EHC entre a 1ª e a 3ª biópsia, não ocorreram diferenças significativas em relação às fêmeas submetidas aos outros preparados, inclusive àquelas submetidas ao tratamento à base de SF. Neste caso, também tiveram aumento do diâmetro dos ovócitos quando, à 1ª biópsia, eles apresentaram variação de 875 a 1.175  $\mu\text{m}$ , com média de  $1.008,5 \pm 78 \mu\text{m}$  e 7,7% de CV, enquanto, à 3ª biópsia, se encontravam com diâmetro variando de 850 a 1.250  $\mu\text{m}$ , com média de  $1.074,5 \pm 74,8 \mu\text{m}$  e 7% de CV (TAB. 9).

Ocorreram diferenças significativas entre diâmetros dos ovócitos (TAB. 12) apenas em relação às biópsias e, mesmo assim, somente entre as 1ª e 2ª biópsias, enquanto que as 2ª e 3ª biópsias não foram diferentes estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ).

### **3.2.3. Desova**

No experimento realizado no CEPTA, apenas as fêmeas submetidas ao tratamento à base de EHC desovaram (TAB. 6). Com base no teste exato de Fisher, a probabilidade de fêmeas submetidas ao tratamento com EHC desovarem e o mesmo não ocorrer com fêmeas submetidas aos demais tratamentos, nas condições do experimento realizado no CEPTA, é de 99,9%. É de 100% a probabilidade de fêmeas submetidas aos tratamentos a base de LHRH, LHRH+DOM e SF não desovarem naquelas condições.

### **3.2.4. Fecundação**

Todos os machos liberaram sêmen suficiente e com boa viscosidade. Para a fecundação dos ovos liberados, utilizou-se mais de um macho para fecundar os ovos coletados em cada bacia, cuja fertilização foi feita a seco.

Das 5 desovas obtidas em fêmeas tratadas com EHC, apenas 3 apresentaram ovos viáveis, com taxas de fecundação variando de 16,8% a 30,7%, com média de 23,47% e coeficiente de variação de 29,8% (TAB. 6 e FIG. 7). Não foram consideradas para análise de fecundação as fêmeas submetidas aos demais tratamentos, por não terem desovado.

#### 4. DISCUSSÃO

AZEVEDO & CANALE (1938) já, há muitas décadas, associavam o desenvolvimento das gônadas dos peixes às condições ambientais. As espécies de peixes reofílicos (CASTAGNOLLI & TONIOLO, 1980) quando se encontram no seu habitat natural, na época da reprodução migram em busca da complementação de situações fisiológicas e ambientais favoráveis à desova. Quando cultivadas em cativeiro, onde as condições são distintas daquelas de seu ambiente nativo e que com frequência apresentam ritmos climáticos e regime nutricional diferentes daqueles aos quais a espécie está geneticamente adaptada, é de se esperar que haja variações na evolução do processo de maturação das gônadas, quando comparadas às situadas no ambiente natural. Talvez isto tenha acontecido com matrizes de pacu capturadas no rio Cuiabá, cujas desovas induzidas às margens daquele rio apresentaram desempenho reprodutivo superior às realizadas no CEPTA em anos seguintes (FERRAZ DE LIMA, 1989).

A determinação das épocas onde possam ser obtidos picos de desovas induzidas das espécies de peixes criadas em cativeiro, ainda não se encontra totalmente elucidada. No que diz respeito à possibilidade de se manipular aqueles períodos de modo a se ampliar as épocas de propagação artificial, adequando-as à demanda de alevinos, esta ainda não é explorada em nossas condições, embora KUO & NASH (1975) tenham mostrado que é possível estimular a vitelogênese de *Mugil cephalus* L., controlando a temperatura e o fotoperíodo e Bromage *et al.* (1984) afirmaram que controles na duração da exposição diária à luz podem alterar a

época de desova em *Salmo gairdnerii* (Richardson). Além da dificuldade ainda encontrada para se manipular os períodos de desova dos peixes teleósteos, têm-se ainda a incerteza do momento para atingimento de ovulação espontânea, mesmo dentro da estação de reprodução (CRIM & GLEBE, 1984). Normalmente são exigidos frequentes manejos dos plantéis de reprodutores ao longo de cada período de desova, visando a identificação do melhor momento à propagação artificial.

Atualmente, a identificação das condições propícias à indução da desova em peixes teleósteos é obtida através de: a) exame das características morfológicas externas dos reprodutores e matrizes (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983; VAN WEERD *et al.*, 1990; ROMAGOSA, 1991); b) pressão da porção ventral de fêmeas e machos, percebendo-se sua flacidez nas fêmeas ou a liberação de sêmen com adequada viscosidade nos machos (CAROLSFELD, 1989); c) presença em algumas espécies de peixes de protuberâncias ásperas (órgãos perlados) nas áreas dorsais das nadadeiras peitorais e, às vezes, na cabeça de machos que, embora não bem visíveis, podem ser percebidas ao tato (KUO *et al.*, 1974; WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983); d) análise da posição da vesícula germinativa dos ovócitos, exames histológicos realizados nas gônadas e diâmetro atingido pelos ovócitos, obtidos por biópsia ovariana (KUO *et al.*, 1974; JALABERT, 1976; BILLARD, 1979; GARCIA, 1989b); e) determinação do índice gonado-somático em exemplares sacrificados do plantel a ser propagado (KUO & NASH, 1975; VAZZOLER, 1981; FERRAZ DE LIMA *et al.*, 1984); f) determinação dos níveis de gonadotrofina na corrente sanguínea obtidos por radioimunoensaio (PETER, 1983; DOWN *et al.*, 1988); g) determinação de elevadas concentrações de cálcio e proteína no sangue (BOOKE, 1964; WOODHEAD, 1968 citado por KUO *et al.* 1974); e h) análise de fatores abióticos, como a temperatura, a pluviosidade e o fotoperíodo (AZEVEDO & CANALE, 1938; BILLARD, 1979; PETER, 1983; BROMAGE *et al.*, 1984).

Na realização da presente dissertação, em que se procurou trabalhar em dois locais geograficamente distantes entre si, um dos quais fora da bacia hidrográfica do Prata, onde o pacu é nativo (CASTAGNOLLI & ZUIM, 1985), era presumível que diferenças climáticas determinassem épocas diferentes de picos de desova (FERRAZ DE LIMA, 1989). Diversos autores estabelecem graus de importância distintos àqueles fatores abióticos na maturação gonadal de teleósteos: alguns creditam à temperatura destacado papel na aceleração do desenvolvimento gonadal, por sua influência nos processos endócrinos que afetariam a produção e liberação de hormônios hipotalâmicos e gonadotróficos (KUO & NASH, 1975; PETER, 1983); há os que dão grande relevância ao fotoperíodo (KUO & NASH, 1975; BROMAGE *et al.*, 1984) que, através das funções fotossensorial e secretora da glândula pineal e, talvez, da retina, induz a produção do hormônio mensageiro melatonina, que age no processo de liberação/inibição da secreção de hormônios hipotalâmicos (BAGGERMAN, 1979; PETER, 1982, 1983); a maturação final e a desova estão associadas, nas espécies reofílicas, também segundo alguns autores, às chuvas, que têm significativa participação nos eventos endócrinos e fisiológicos da reprodução (AZEVEDO & CANALE, 1938; BILLARD, 1979; IHERING & AZEVEDO, 1981).

FERRAZ DE LIMA (1981) afirma que, no ambiente natural do pantanal do Mato Grosso, o período de desova do pacu ocorre entre os meses de outubro e janeiro, principalmente nos meses de novembro e dezembro, coincidindo este último com o período relatado por BERNARDINO *et al.* (1986) citados por ROMAGOSA (1991) para as reproduções realizadas no CEPTA. FERRAZ DE LIMA *et al.* (1984) citam que o período de desova do pacu em seu habitat natural se dá entre os meses de outubro e dezembro, com maior frequência no mês de novembro. ROMAGOSA *et al.* (1985) identificaram o período de novembro a fevereiro como aquele em que o pacu apresenta condições satisfatórias para a desova. Tendo em vista que até o momento não se dispunha de estudos comparativos, quanto a melhor época para atingimento da maturação gonadal do pacu, entre o CEPTA, em Pirassununga, SP, e a UPG, em Porteirinha,

MG, teve-se que escolher por qual dos dois locais se iniciaria este trabalho. Pretendia-se testar o emprego dos indutores de maturação gonadal e de desova nos momentos mais próximos possíveis de pico de desova desta espécie naqueles ambientes. Determinou-se então o início do experimento pela UPG, por considerar que a temperatura naquele local já se encontrava bem mais elevada do que no CEPTA e que este fator poderia ser decisivo para que não se perdesse a melhor época de desova nos dois locais.

#### **4.1. Etapa do Experimento na UPG**

Verificou-se ainda na 1ª quinzena do mês de novembro/89, que as fêmeas de pacu da UPG não denotavam características morfológicas externas favoráveis para indução à desova. Iniciada a 2ª quinzena daquele mês e como não ocorrera mudança substancial naquelas características, deu-se início ao experimento, levando-se em conta o adequado número de repetições a serem realizadas e o bloqueamento estatístico que estava sendo empregado, que submetia todos os tratamentos às mesmas condições. A espera por uma melhor preparação das fêmeas poderia atrasar o início do experimento no CEPTA e, em consequência, as fêmeas daquele local poderiam ser encontradas em fase mais avançada de maturação ovocitária, o que dificultaria a comparação dos resultados entre os dois locais.

##### **4.1.1. Maturação Ovocitária**

Através da análise da migração do núcleo dos ovócitos, verificou-se incidência elevada daqueles com vesícula germinativa na posição central, sem registro de ovócito com membrana nuclear rompida e sequer ovócito com núcleo tocando em sua membrana. Embora esta condição tenha se repetido ao longo do experimento na UPG, ela não refletia o aspecto morfológico externo das fêmeas à medida que avançavam as repetições. Foi observado, visualmente, aumento no volume e abaulamento do abdome das fêmeas a cada nova seleção, o que veio facilitar a

escolha daquelas a serem testadas. Finalmente, as condições de maturação ovocitária e de morfologia externa das fêmeas se corresponderam à 3ª biópsia, quando a presença de ovócitos maduros, ou seja, com a membrana nuclear rompida (JALABERT, 1976; BILLARD, 1979; GOETZ, 1983; MATSUYAMA *et al.*, 1988), foi superior nos 3 últimos blocos. Isto está de acordo com o que afirmaram JALABERT & FOSTIER (1984), que não acharam que a determinação da posição da vesícula germinal fosse um critério seguro para a classificação das fêmeas, e com o obtido por BILLARD *et al.* (1984), que não conseguiram relacionar a resposta à aplicação de LHRH-A e de extrato de pituitária com a posição inicial da vesícula germinativa do ovócito de *Cyprinus carpio*. Confirmando-se o avanço na maturação ovocitária, percebeu-se ainda, à 3ª biópsia, nítida clarificação do vitelo nos ovócitos maduros, tal como registrado para várias espécies de peixes (WALLACE & SELMAN, 1981; GOETZ, 1983).

Pelos resultados obtidos, verificou-se que, indistintamente, as soluções (EHC, LHRH e LHRH+DOM) proporcionaram a maturação ovocitária das fêmeas de pacu exclusivamente após a aplicação da 2ª dose, o que está de acordo com observações feitas por ROMAGOSA *et al.* (1990). Os ovócitos apresentaram em sua quase totalidade, à 3ª biópsia, a condição de MNR (JALABERT, 1976; BILLARD, 1979; GURAYA, 1986; ZANUY & CARRILLO, 1987), que condiz com resultados citados por PETER (1983), RAMOS (1986) e CURY & TSUKAMOTO (1988), que indicaram a ação estimulatória do LHRH na liberação de gonadotrofina e o efeito desta na consequente maturação gonadal.

Neste caso, funcionaram o que DONALDSON & HUNTER (1983), GURAYA (1986) e CURY & TSUKAMOTO (1988) chamaram de técnicas de 1ª e 2ª gerações na propagação de peixes. A utilização de extratos de pituitária homoplástico e heteroplástico agindo no eixo hipófise-ovário, como o EHC empregado nesta dissertação, pode ser considerada como técnica de 1ª geração, enquanto que o aproveitamento do LHRH e do LHRH+DOM, que atuam no eixo hipotálamo-hipófise, é tido como técnica de 2ª geração.

#### 4.1.2. Desova e Fecundação

Embora tenha sido expressivo o percentual de ovócitos maduros em todas as fêmeas à 3ª biópsia, este fato não se refletiu numa elevada quantidade de ovos liberados nem em altas taxas de fecundação. Tais resultados estão de acordo com os citados por FERRAZ DE LIMA *et al.* (1988) e ROMAGOSA (1991), o que nos leva a supor que as doses aplicadas foram insuficientes para que tivesse ocorrido ovulação em boa parte do ovário ou que a eficiência dos indutores maturacionais, empregados em etapas precoces de maturação ovocitária, tenha sido baixa. CRIM & GLEBE (1984) tiveram o mesmo problema quando induziram a desova de *Salmo salar* bem antes da época normal de propagação. Eles admitiram a possibilidade de ter ocorrido ovulação incompleta, não havendo abertura da micrópila para a penetração do espermatozóide. Há autores que consideram que a não fecundação de ovócitos ovulados pode ser devida à possibilidade destes ainda se encontrarem em parte imaturos (AZEVEDO & CANALE, 1938; JALABERT, 1976; GOETZ & BERGMAN, 1978; ZANUY & CARRILLO, 1987).

Deve ser ressaltado ainda que, com o fato de nem todas as fêmeas terem liberado óvulos à primeira tentativa de extrusão, passou-se a contar com outra variável, a sincronização entre machos e fêmeas. Embora não tenha havido falta de sêmen às extrusões ocorridas posteriormente à 1ª tentativa, não é certo que o sêmen obtido tenha apresentado a mesma fecundidade que na primeira.

O tratamento à base de LHRH + DOM apresentou probabilidade de ocorrência de desova superior aos outros dois tratamentos. PETER *et al.* (1985, 1987) citados por LIN *et al.* (1988) mostraram que o sGnRH-A, associado ao antagonista de dopamina Pimozida, foi várias vezes mais potente que o LHRH-A em *Carassius auratus*. Além disto, PETER *et al.* (1986) e OMEJANIUK *et al.* (1987), estes últimos citados por LIN *et al.* (1988), verificaram que a Domperidona apresenta igual ou maior eficiência que a Pimozida na potencialização do

LHRH-A na liberação de GtH na mesma espécie. LIN *et al.* (1988) obtiveram significativa liberação de GtH em *Paramisgurnus dabryanus* com a aplicação de DOM, enquanto peixes que receberam PIM apresentaram respostas idênticas aos controles. Enquanto isto, LIN *et al.* (1991) colocam a Domperidona e a Pimozida como os mais potentes antagonistas de dopamina na ação do GnRH em *C. auratus*. Isto nos leva a admitir que a Domperidona tenha, no experimento realizado na UPG, potencializado a ação do LHRH através do bloqueio dos receptores de dopamina na hipófise, embora que nossos resultados tenham ficado abaixo dos obtidos por GODINHO & GODINHO (1986), SILVA FILHO (1986), CURY & TSUKAMOTO (1988) e FERRAZ DE LIMA *et al.* (1988), provavelmente conseguidos em épocas mais favoráveis de desova.

Quanto à aplicação do EHC, este pode ter proporcionado a maturação ovocitária, mas não a ovulação e, quando ela ocorreu, a fecundação foi baixa. Experimento realizado por PÉTER GARÁDI, em Petrolina, PE, no ano de 1985, com o *Colossoma macropomum* (informação verbal), que tinha como objetivo aplicar doses preparatórias de EHC em 0,1 mg/kg em 3 etapas, sendo uma a cada 3 semanas, visando a antecipação do período de desova e/ou melhorar a performance das fêmeas na liberação de ovos viáveis, tanto do ponto de vista qualitativo (melhor índice de fecundação) quanto quantitativo, apresentaram estatisticamente resultados idênticos, quando comparados ao obtido nas fêmeas controle. FERRAZ DE LIMA (1989) também não obteve resultados satisfatórios na antecipação da maturação gonadal do pacu com o emprego de hipófise e de ração contendo hipófise e tiroxina. Além disso, ZANUY & CARRILLO (1987) afirmam que elevadas doses de GtH em etapas precoces do desenvolvimento gonadal, ainda que possam proporcionar a maturação dos gametas, podem também determinar baixa qualidade dos mesmos.

## 4.2. Etapa do Experimento no CEPTA

Ainda na fase inicial de seleção das fêmeas de pacu no CEPTA, constatou-se uma situação bem diferente em relação à encontrada na UPG, em termos de amadurecimento ovocitário. Enquanto na UPG, em Minas Gerais, as fêmeas de pacu apresentavam características morfológicas externas peculiares àquelas que ainda não haviam atingido condição favorável à desova, as do CEPTA, em São Paulo, ao contrário, davam nítida impressão de que já estariam ultrapassando a fase ideal de seleção para propagação artificial, quando comparadas com fêmeas induzidas satisfatoriamente e com ovos viáveis, em desovas levadas a cabo na UPG em anos anteriores. Como o plantel utilizado neste experimento já havia passado por repetidas seleções, em função de outros testes a que eram submetidos na mesma estação de desova, é possível que o estresse decorrente de sucessivos manejos tenha, primeiramente, acelerado a maturação gonadal e ovulação (JALABERT, 1976) e, em seguida, antecipado a reabsorção dos ovócitos, uma vez que as fêmeas apresentavam excessiva flacidez da região ventral, o que poderia ser decorrente do início da atresia folicular (BALL, 1960 citado por WALLACE & SELMAN, 1981; GURAYA, 1986; MATSUYAMA *et al.*, 1988; LIMA *et al.*, 1991).

### 4.2.1. Maturação Ovocitária

Diferentemente do que ocorreu na UPG, as fêmeas apresentaram, desde a 1ª biópsia, ovócitos nos 4 diferentes estádios maturacionais considerados neste trabalho. Verificou-se, à 3ª biópsia, que apenas as fêmeas submetidas ao tratamento com EHC apresentaram reação satisfatória às 4 soluções, atingindo elevados níveis de ovócitos com MNR (acima de 90%). Os demais tratamentos (LHRH, LHRH+DOM e SF) apresentaram, à 3ª biópsia, índices inferiores a 10% de ovócitos com MNR, não havendo diferença estatisticamente significativa nem entre eles, nem em relação ao obtido à 1ª biópsia.

Nem mesmo as fêmeas que receberam LHRH juntamente com a DOM apresentaram resultados satisfatórios. Peter (1983) evidenciou a importância da GRIF em *C. auratus*, mas ressaltou que sua ação ocorre em menor grau em fêmeas sexualmente regredidas. Essa afirmação nos leva a admitir que a partir de um adiantado estágio do ciclo reprodutivo, o antagonista de dopamina, como a Domperidona que foi utilizada neste experimento, já atuem de maneira menos eficaz. Neste caso, é possível que a retroalimentação negativa provocada pelos esteróides gonadais passe a ter maior influência na liberação/inibição de gonadotrofina pela hipófise (DONALDSON & HUNTER, 1983; PETER *et al.*, 1986; TRUDEAU *et al.*, 1991), que a dopamina. A partir dessa premissa e por agirem no eixo hipotálamo-hipófise, e não no segmento hipófise-ovário como o EHC, a resposta à aplicação do LHRH e do LHRH+DOM, numa fase de adiantado estágio de maturação ovocitária, poderia ser pouco eficaz, comparada à aplicação direta do GtH. Talvez se, nesses casos de adiantado avanço no desenvolvimento gonadal, as doses de LHRH fossem de maior potência ou duração, como o efeito provocado por análogos de GnRH (PETER *et al.*, 1986; ZANUY & CARRILLO, 1987; LIN *et al.*, 1991), poder-se-ia obter melhores resultados.

#### 4.2.2. Desova e Fecundação

Mesmo com todas as fêmeas submetidas ao tratamento a base de EHC tendo desovado, tanto o peso da ova liberada quanto a taxa de fecundação foram baixos, embora que mais de 90% dos ovócitos estivessem com MNR quando da extrusão.

Como SILVA FILHO (1986) conseguiu elevado percentual de desova em fêmeas de pacu com 266 horas-grau (h-g), CURY & TSUKAMOTO (1988) apresentaram resultados positivos com valor médio próximo a 250 h-g e FERRAZ DE LIMA *et al.* (1988) obtiveram ovulação também com esta espécie entre 270 e 290 h-g, principalmente, é possível que a tentativa de extrusão com 300 h-g, observadas neste experimento, tenha sido atrasada,

ensejando menor liberação de ovos, bem como baixa taxa de fecundação. Não se pode deixar de considerar, entretanto, que GODINHO & GODINHO (1986), BERNARDINO *et al.* (1988) e ROMAGOSA *et al.* (1990) trabalhando com esta espécie, obtiveram respostas satisfatórias também com cerca de 300 a 325 h-g, o que motivou o estabelecimento de uma média em torno de 300 h-g para a extrusão das fêmeas de pacu desta pesquisa. Além do mais, a partir de 250 h-g eram realizadas observações do comportamento das fêmeas, visando detectar possíveis movimentos ovulatórios (WOYNAROVICH, 1986), que motivaria a antecipação da 3ª biópsia e da extrusão e isto somente foi verificado em dois casos, quando se encontravam com 293 h-g e 278 h-g (TAB. 6).

Como as fêmeas submetidas aos demais tratamentos não desovaram, e sequer apresentaram índices razoáveis de ovócitos com MNR, provavelmente pelo início de atresia folicular, é possível que a baixa qualidade dos ovócitos tenha comprometido também os resultados de desova e fecundação das fêmeas submetidas ao tratamento com hipófise de carpa comum. BARR (1968) citado por GURAYA (1973) admite que a atresia em ovários de vertebrados não mamíferos pode ser devido à falta ou ao baixo nível de gonadotrofina. Se isto realmente ocorreu, é possível que, atingido adiantado estágio de desenvolvimento gonadal, motivado por condições climáticas favoráveis e/ou pelo estresse decorrente de excessivo manejo, tenha sido requerido uma maior quantidade de gonadotrofina para ovulação espontânea. Como o peixe não dispunha da quantidade de gonadotrofina necessária à esta ovulação, teria então se iniciado o processo de atresia folicular, que reduziu a qualidade dos ovócitos. Ou, então, a baixa dosagem de gonadotrofina aplicada (EHC) tenha sido pequena para o adiantado estágio de maturação gonadal, o que poderia ter provocado, também, início de atresia, ensejando, da mesma forma, queda na qualidade dos ovócitos.

### 4.2.3. Diâmetro dos Ovócitos

A medida do diâmetro médio dos ovócitos tem sido usada para caracterizar a maturidade sexual de peixes (KUO *et al.*, 1974; KUO & NASH, 1975; TAMARU *et al.*, 1988). GODINHO & GODINHO (1986), trabalhando com pacu, constataram incremento no diâmetro do ovócito de  $1.097 \pm 14 \mu\text{m}$  à 1ª dose, para  $1.252 \pm 14 \mu\text{m}$  à extrusão e CAROLSFELD *et al.* (1988) testaram a aplicação de dose mínima efetiva de LHRH-A em fêmeas que apresentaram ovócitos com diâmetro médio inicial com  $1.060 \pm 7 \mu\text{m}$ . ROMAGOSA *et al.* (1990), por sua vez, apresentaram faixas modais de diâmetro de ovócitos para fêmeas de pacu, nos 1º e 2º anos de maturação gonadal, como sendo inicialmente de 876,4 , 939,0 ou 1.001,6  $\mu\text{m}$ , tendo o valor intermediário como preponderante. Estes valores são, portanto, inferiores às medidas observadas pelos autores citados anteriormente.

No presente experimento, o diâmetro médio inicial variou de 750 a 1.250  $\mu\text{m}$  e, à 3ª biópsia, ele oscilou entre 900 e 1.250  $\mu\text{m}$ . Enquanto isto, o diâmetro médio inicial dos ovócitos das fêmeas que desovaram e com ovos fecundados foi de  $985,5 \pm 88,5 \mu\text{m}$ , tendo sido um pouco superior à moda preponderante, mas inferior à maior moda apresentada no trabalho de ROMAGOSA *et al.* (1990) e inferior aos observados por GODINHO & GODINHO (1986) e CAROLSFELD *et al.* (1988). É possível que as diferenças possam ter como causa o estágio de maturação em que se encontravam os ovócitos, que tendem a reduzir de tamanho quando se encontram em regressão (CAROLSFELD, 1989; LIMA *et al.*, 1991) ou podem ser devidas à ação do líquido fixador, fazendo-os reduzir de tamanho, embora o tempo entre a coleta e a leitura não tenha ultrapassado a primeira hora.

Ainda que tenha havido aumento no diâmetro dos ovócitos das fêmeas submetidas às 4 soluções entre a 1ª e a 3ª biópsias, as diferenças não foram estatisticamente significativas entre as soluções, incluindo o tratamento a base de solução fisiológica ( $p \leq 0,05$ ). Além disto, a diferença registrada no diâmetro dos ovócitos só foi verificada entre as 1ª e 2ª biópsias. Como

a diferença na taxa de ovócitos maduros, nas fêmeas submetidas às 4 soluções, só se deu entre as 2ª e 3ª biópsias, nos parece que o diâmetro não seja, isoladamente, um parâmetro efetivo para avaliar a maturação ovocitária de pacu naquelas condições.

### 4.3. Comparação dos Resultados da UPG e do CEPTA

#### 4.3.1. Fatores Abióticos

Dados obtidos na UPG e no CEPTA no ano de 1989 (TAB. 13 e FIG. 9) registram precipitações pluviométricas (em mm) ocorridas no período de setembro a dezembro, meses que antecedem e/ou quando ocorrem os picos de desovas do pacu no ambiente natural (FERRAZ DE LIMA, 1981; FERRAZ DE LIMA *et al.*, 1984) e no CEPTA (BERNARDINO *et al.*, 1986 citados por ROMAGOSA, 1991). Até meados do mês de outubro as chuvas, tanto em volume como em frequência, ocorreram em maiores níveis no CEPTA que na UPG, enquanto somente na última semana do mês de novembro é que maior frequência de chuvas se verificou na UPG. Como os picos de desova estão associados nas espécies reofílicas às chuvas (AZEVEDO & CANALE, 1938; BILLARD, 1979; IHERING & AZEVEDO, 1981), principalmente às enxurradas (ZANUY & CARRILLO, 1987), parece que, neste caso, se confirmou a influência da pluviosidade na desova do pacu, mesmo em condições de confinamento, uma vez que os reprodutores se apresentaram em condições de desova primeiramente no CEPTA, provavelmente no mês de novembro, e que as evidências indicam que somente no início do mês de dezembro é que as condições de maturação gonadal estariam satisfeitas para a desova do pacu na UPG.

Quanto ao fotoperíodo (TAB. 13 e FIG. 10), medido em horas de luz por dia (ANUÁRIO OBSERVATÓRIO NACIONAL, 1975), corrigidos para as localizações geográficas de Porteirinha/MG e Pirassununga/SP (ENCICLOPÉDIA DOS MUNICÍPIOS BRASILEIROS -

IBGE, 1979), no CEPTA ocorreram horas de luz solar diárias em maior quantidade do que na UPG, à medida que avançavam os meses de setembro a dezembro. O CEPTA se situa dentro da faixa de latitude onde se localiza o pantanal do Mato Grosso (STEFAN, 1964 citado por FERRAZ DE LIMA, 1981) e a uma diferença superior a 6° S em relação à UPG. Considerando-se a coincidência do período de pico de desova entre o CEPTA e o ambiente natural do pacu, o retardamento do início da desova na UPG pode também ter tido como causa o fotoperíodo, pois a quantidade de hora de luz/dia ocorrida no CEPTA no mês de novembro, só foi registrada na UPG no mês de dezembro.

No que diz respeito às temperaturas médias mensais dos tanques, foram registrados na UPG 24,9 °C, 25,8 °C e 27,1 °C e no CEPTA 21,4 °C, 22,5 °C e 24,8 °C, respectivamente, nos meses de setembro, outubro e novembro/89 (TAB. 13 e FIG. 11). Enquanto no CEPTA as primeiras induções reprodutivas do pacu por nós presenciadas, em outras propagações realizadas naquela estação de desova, se davam desde o final do mês de outubro e início de novembro, quando a temperatura oscilava em torno dos 22 °C, na UPG temperaturas superiores a estas já ocorriam no mês de setembro. No entanto, só no final do mês de novembro e início de dezembro, quando a temperatura variava em torno dos 27 °C, é que os pacus da UPG se apresentavam em condições de desova, o que pressupõe não ter sido a temperatura o fator climático limitante ou estimulante à maturação final ovocitária e desova, diferentemente do observado por Lima (1990), que em seu trabalho realizado no CEPTA, encontrou que, das condições climáticas, a temperatura foi o parâmetro que mais contribuiu para a maturação final gonadal daquela espécie de peixe.

Dada a comparação dos dois locais, nos parece mais razoável associar o avanço da maturação final ovocitária do pacu, no que diz respeito às condições climáticas, principalmente ao progressivo aumento dos fotoperíodo e pluviosidade, embora que a temperatura deva atingir um patamar mínimo a partir do qual os processos de maturação final e ovulação possam

acontecer.

#### 4.3.2. Tratamentos, Maturação Ovocitária Final e Desova

DONALDSON & HUNTER (1983) propõem que o LHRH pode ser empregado na maturação ovocitária, além de estimular a ovulação. RAMOS (1986), utilizando LHRH-A em fêmeas de *Solea solea* (L.), obteve desova semi-natural após 48 horas da aplicação do tratamento, que teve continuidade por mais 25 dias, enquanto que as fêmeas controle só iniciaram a desova um mês após o início do tratamento e prosseguindo por 5 semanas, mostrando que efetivamente houve antecipação do período de desova pela ministração de LHRH-A. Resultados idênticos foram obtidos por GARCIA (1990) que testou o uso de "peller" de LHRH-A e de 17  $\alpha$ -metiltosterona e suas combinações em *Lates calcarifer* (Bloch), conseguindo significativo desenvolvimento gonadal e desova antes da época normal de desova daquela espécie. ZANIBONI FILHO & BARBOSA (1991), realizando aplicação prévia de extrato de hipófise de carpa com 0,25 mg EHC/kg em *C. macropomum* e *P. mesopotamicus*, 3 dias antes das duas doses normais (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983), obtiveram resultados superiores no que diz respeito à proporção de fêmeas que desovaram, embora que o percentual de ovos liberados por fêmea tenha sido menor em pacu e superior em tambaqui, quando comparados com fêmeas que foram induzidas também com EHC ou LHRH-A, mas sem a aplicação da dose prévia. Já CRIM & GLEBE (1984) observaram variações nas respostas à aplicação de "peller" de LHRH-A em *Salmo salar* em diferentes épocas. 30% das fêmeas desovaram quando induzidas 7 semanas antes do período normal de desova e mais de 90% desovaram 4 semanas antes do tempo normal de propagação. Apesar dos resultados satisfatórios na indução precoce, no 1º caso 100% dos ovos obtidos goraram 24 horas após a fertilização e no 2º caso apenas 50% dos ovos obtidos foram de boa qualidade. Vale lembrar, no entanto, que não foi obtida antecipação do período de desova com o uso de extrato de pituitária em trabalhos realizados por PÉTER GARÁDI (1985; informação verbal) com *C. macropomum*

nem por FERRAZ DE LIMA (1989) com *P. mesopotamicus*.

Pelos resultados obtidos na UPG, o tratamento a base de LHRH+DOM foi o que apresentou maior número de desovas e mais elevadas taxas de fecundação, enquanto que o realizado a base de EHC foi o que apresentou menor número de desovas e mais baixas taxas de fecundação. Considerando-se as observações contidas em DONALDSON & HUNTER (1983), RAMOS (1986) e GARCIA (1990), é possível presumir que, em estágios próximos à fase de maturação gonadal final, as ações do LHRH e da Domperidona tenham conseguido promover a liberação da gonadotrofina necessária em maior grau que a proporcionada pelo LHRH isoladamente e pelo EHC mas, provavelmente, em quantidade insuficiente ou ainda antes do momento propício à indução para a extrusão da totalidade de ovos na condição de viáveis. É possível supor, ainda, que o extrato hipofisário heteroplástico, aplicado antes da maturação gonadal natural oriunda da ação de hormônio gonadotrófico do próprio peixe, pode não conter a(s) gonadotrofina(s) específica(s) (KUO *et al.*, 1974; JALABERT *et al.*, 1977; DONALDSON & HUNTER, 1983; PETER *et al.*, 1986) que proporcionaria(m) a conclusão da maturação final e não somente a ovulação, embora que CHANG *et al.* (1988) admitam que, independentemente da espécie e do gênero do peixe receptor, a gonadotrofina de outra espécie possa sempre ser eficaz.

Com referência às fêmeas de pacu do CEPTA, onde somente as tratadas com EHC desovaram, embora com taxas de fecundação baixas, as evidências indicam que os ovócitos já haviam passado por um longo período de espera em condições de serem estimulados para a maturação final e ovulação. Isto pode ser confirmado pela ocorrência de outras propagações presenciadas desde o final do mês de outubro e início de novembro com este plantel dentro da mesma estação de desova. O manejo frequente de fêmeas ovadas pode ter provocado o início de atresia folicular (JALABERT, 1976; LIMA *et al.*, 1991). É também possível que, de acordo com resultados obtidos por LILEY & ROUGER (1990) com *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum),

mesmo permanecendo viáveis por longo tempo, tão logo tenha acontecido o início do mecanismo de regressão ovariana, rapidamente foi registrada a queda na qualidade dos ovócitos. Estes autores citam, ainda, que trabalhos com *Salmo gairdneri* R. realizados por NOMURA *et al.* (1974), SAKAI *et al.* (1975), BRY (1981), ESCAFFRE & BILLARD (1979), CRAIK & HARVEY (1984) e SPRINGATE *et al.* (1984) evidenciaram um declínio na qualidade dos ovos com o progressivo tempo de retenção dos mesmos nas gônadas. WEIL *et al.* (1975, 1978) citados por CRIM *et al.* (1983a) admitem que podem ocorrer mudanças na sensibilidade da hipófise de teleósteos na produção de gonadotrofina, à aplicação de LHRH comum, dependendo da fase de maturação gonadal. Entretanto CRIM *et al.* (1983a) obtiveram incremento na produção de gonadotrofina em diferentes períodos do ano ao empregarem análogos de LHRH em *Salmo salar*. Na etapa final da estação de desova, estes autores conseguiram estender o período de espermiacão com LHRH-A, mas na fase de regressão gonadal, ainda que tenham conseguido elevar os níveis circulantes de GtH no sangue de machos, somente ocorreram tendências de elevação do IGS, porém estatisticamente insignificantes.

Como se poderia deduzir, o LHRH comum empregado nesta dissertação não é comparável ao LHRH-A na propagação artificial do pacu. É provável, também, que sua ministração em etapas iniciais de regressão gonadal não seja eficaz na obtenção de ovos viáveis. Enquanto isto, a aplicação do EHC ainda que tenha conseguido proporcionar a desova no início do período de regressão ovocitária, os ovos já não apresentaram boa qualidade, o que determinou a baixa fecundidade.

A presente dissertação apresentou resultados quase que opostos entre as etapas do experimento na UPG e no CEPTA, possivelmente por terem sido realizados, respectivamente, em períodos que antecederam a melhor época para a desova ou quando as fêmeas já se encontravam em prolongada condição de adiantada maturação ovocitária e, neste caso, talvez em início de atresia folicular. É necessário esclarecer ou confirmar questões não bem definidas,

quais sejam: 1º) Idades e regimes alimentares diferentes dos dois plantéis influenciaram os resultados? 2º) A não ocorrência de desova ou o baixo índice de fecundação poderiam ter tido como causa o tamanho da dose ou a eficácia dos produtos utilizados nas induções? 3º) Para os casos em que a extrusão só foi obtida após 300 h-g, houve a influência na sincronização entre machos e fêmeas no índice de fecundação? 4º) Como outras seleções já haviam sido realizadas no plantel do CEPTA, os baixos resultados obtidos neste local não poderiam ser devido à retirada dos melhores exemplares, restando para este experimento fêmeas normalmente expurgadas nas primeiras propagações? 5º) Fatores climáticos e variáveis físico-químicas registradas na UPG e no CEPTA não teriam provocado efeitos diferentes à aplicação das soluções nos dois locais? 6º) Se os fatores climáticos influenciaram os resultados, não poderiam ser manipulados visando a ampliação do período de desova do pacu em nossas condições? 7º) Hipófises heteroplásticas aplicadas em períodos que antecedem ou quando ultrapassam a época ideal de propagação poderiam não conter alguma gonadotrofina específica para esta espécie de peixe?

Para tentar dar respostas à estas questões, é necessário que novos experimentos sejam realizados, onde dever-se-iam:

- 1º Realizar blocos de repetição nas fases anteriores, normais e posteriores a cada época ideal de desova do pacu, tanto na UPG quanto no CEPTA.
- 2º Utilizar lotes diferentes de mesmos plantéis, mantidos em tanques distintos, para cada fase do ítem anterior, visando reduzir a influência do estresse, decorrente do manejo, no desenvolvimento/regressão da maturação ovocitária;
- 3º Realizar o acompanhamento das condições climáticas e das variáveis físico-químicas da água, de forma a se verificar a influência destes fatores na maturação ovocitária final, ovulação e fecundação;

- 4° Realizar a coleta do sêmen dos machos, conservando-o adequadamente para posteriores utilizações, de forma que extrusões verificadas em diferentes ocasiões não influenciem a taxa de fecundação dos ovos pela falta de sincronização entre machos e fêmeas;
- 5° Realizar exames histológicos das gônadas e determinar os níveis de gonadotrofina no plasma ao longo de todo o experimento e, se possível, determinar os níveis de esteróides, especialmente o  $17\alpha, 20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-2-one ( $17\alpha, 20\beta$ -DHP) e o  $17\beta$ -estradiol, visando a verificação de provável correlação entre suas presenças e a ocorrência de retroalimentação positiva ou negativa;
- 6° Utilizar para os dois locais plantéis com mesma idade de maturação gonadal, submetendo-os a idênticos regimes nutricionais;
- 7° Testar o uso de hipófises homoplástica e heteroplásticas, verificando a existência de diferentes efeitos que justifiquem a presença de hormônios gonadotróficos específicos da espécie atuando em etapas anteriores e posteriores à maturação/regressão gonadal;
- 8° Pelos diferentes resultados obtidos por diversos autores em termos de unidades térmicas acumuladas (medidas em nº de hora-grau) à ocorrência de desova a partir da aplicação dos indutores maturacionais, realizar experimentos prévios para a determinação do mais provável momento da ovulação, visando a extrusão de boa parte do conteúdo do ovário num mesmo instante, de modo a se obter melhores índices de fecundação para cada tipo de hormônio utilizado.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

A criação de novas técnicas para obtenção de maturação final ovocitária e desova de peixes teleósteos, em substituição à tradicional hipofiseção, vem sendo buscada por pesquisadores em todo o mundo, como forma de superar limitações no uso de pituitárias de peixes doadores, como seus elevados custos, dificuldade de obtenção em alta escala e variação nos teores hormonais. Dentre os mais promissores indutores de maturação gonadal final e de desova obtidos estão o LHRH-A e o GnRH-A, associados ou não a antagonistas de dopamina.

O presente trabalho visou encontrar produtos disponíveis no mercado brasileiro que pudessem ser utilizados com sucesso na propagação artificial de pacu. Em função da não existência de análogos do LHRH ou do GnRH em drogarias do país, optou-se pelo LHRH com identidade estrutural similar ao de mamíferos, vendido com o nome comercial de HRF, associando-o ou não ao antagonista de dopamina Domperidona (DOM), disponível à venda como Motilium. Os resultados foram comparados com os obtidos em fêmeas induzidas com de hipófise de carpa comum (EHC) e com fêmeas tratadas simplesmente com solução fisiológica.

De um total de 5 repetições em cada um dos dois locais e com cada fêmea sendo considerada uma unidade amostral, iniciou-se o experimento pela UPG em 27/11/89 e no CEPTA em 12/12/89. As doses foram divididas em 2 injeções, sendo o LHRH ministrado em

50 e 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a Domperidona foi aplicada em 3,5 e 6,5  $\text{mg}/\text{kg}$ , o EHC foi fornecido em 0,5 e 5,0  $\text{mg}/\text{kg}$  e a solução fisiológica, como controle, foi empregada sozinha em 0,5 e 1,0  $\text{ml}/\text{kg}$ , respectivamente nas 1ª e 2ª doses. Todos os machos receberam EHC, também em 2 doses, em 0,5 e 2,5  $\text{mg}/\text{kg}$ .

Foi escolhido o pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) por seu elevado valor comercial e por sua importância na piscicultura, principalmente na região sudeste do Brasil. Os experimentos foram realizados na Unidade de Piscicultura do Gorutuba (UPG), da CODEVASF, em Porteirinha, MG, e no Centro de Pesquisas e Treinamento em Aquicultura (CEPTA), do IBAMA, em Pirassununga, SP.

A temperatura, que era tida como a variável climática mais importante para o atingimento do estágio de maturação ovocitária favorável à desova induzida, não foi, aparentemente neste caso, o fator mais limitante para que as fêmeas de pacu atingissem plena condição para a propagação artificial. O fotoperíodo e a pluviosidade parecem ter tido maior influência na preparação das fêmeas à desova nos dois locais.

Na UPG, onde as características morfológicas externas das fêmeas de pacu indicavam que ainda não se encontravam em condições favoráveis à propagação induzida, as tratadas com LHRH+DOM apresentaram probabilidade de ocorrência de desova superior às fêmeas que receberam apenas LHRH ou EHC. Além disto, as fêmeas induzidas só com LHRH e as tratadas com EHC apresentaram baixa frequência de desova e, quando estas ocorreram, suas taxas de fecundação foram baixas.

No CEPTA, ao contrário, onde as fêmeas de pacu apresentaram aspectos externos característicos daquelas já em avançado estágio de maturação gonadal, apenas as tratadas com EHC desovaram. As demais, tanto no que diz respeito à maturação ovocitária final quanto à desova, apresentaram resultados estatisticamente idênticos ao observado no grupo controle,

que recebeu somente solução fisiológica.

Estes dados nos levam a supor que a Domperidona tenha potencializado a ação do LHRH apenas no primeiro caso, enquanto que o GtH heteroplástico só tenha atuado eficazmente após as fêmeas terem atingido estágio de maturação gonadal avançado.

Embora tenha havido aumento do diâmetro dos ovócitos, seu crescimento ocorreu principalmente entre a 1ª e a 2ª biópsias, enquanto que o amadurecimento do ovócito, caracterizado pelo rompimento da vesícula germinal, se deu após a 2ª biópsia, quando as fêmeas receberam a 2ª e maior dose dos tratamentos. Isto nos faz presumir que o diâmetro do ovócito não seja, isoladamente, um parâmetro efetivo para avaliar a maturação final ovocitária do pacu naquelas condições.

**TABELA 1**

Protocolo de aplicação utilizado nos experimentos realizados na UPG, no período de 27/11 a 01/12/89, em fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*)

DISCRIMINAÇÃO	TRATAMENTO		
	EHC	LHRH	LHRH+DOM
FÊMEAS POR BLOCO	1	1	1
Nº DE BLOCOS (REPETIÇÕES)	5	5	5
<b>1ª DOSE</b>			
• Fonte de hormônio / kg PC	0,5 mg	50 µg	50 µg
• SF (ml/kg PC)	0,5	0,5	0,5
• DOM (mg/kg PC)	—	—	3,5
• SV (ml/kg PC)	—	—	0,5
<b>2ª DOSE</b>			
• Fonte de hormônio / kg PC	4,5 mg	100 µg	100 µg
• SF (ml/kg PC)	1	1	1
• DOM (mg/kg PC)	—	—	6,5
• SV (ml/kg PC)	—	—	1
INTERVALO (h) ENTRE DOSES	12-13	12-13	12-13

EHC = Hipófise de carpa comum; LHRH = Hormônio liberador de hormônio luteinizante; LHRH+DOM = Hormônio liberador de hormônio luteinizante + Domperidona; PC = Peso corporal; SF = Solução fisiológica; DOM = Domperidona; SV = Solução veículo; h = horas.

**TABELA 2**

Protocolo de aplicação utilizado nos experimentos realizados no CEPTA, no período de 7 a 14/12/89, em fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*)

DISCRIMINAÇÃO	TRATAMENTO			
	EHC	LHRH	LHRH+DOM	SF
FÊMEAS POR BLOCO	1	1	1	1
Nº DE BLOCOS (REPETIÇÕES)	5	5	5	5
1ª DOSE				
• Fonte de hormônio / kg PC	0,5 mg	50 µg	50 µg	—
• SF (ml/kg PC)	0,5	0,5	0,5	0,5
• DOM (mg/kg PC)	—	—	3,5	—
• SV (ml/kg PC)	—	—	0,5	—
2ª DOSE				
• Fonte de hormônio / kg PC	4,5 mg	100 µg	100 µg	—
• SF (ml/kg PC)	1	1	1	1
• DOM (mg/kg PC)	—	—	6,5	—
• SV (ml/kg PC)	—	—	1	—
INTERVALO (h) ENTRE DOSES	12-13	12-13	12-13	12-13

EHC = Hipófise de carpa comum; LHRH = Hormônio liberador de hormônio luteinizante; LHRH+DOM = Hormônio liberador de hormônio luteinizante + Domperidona; PC = Peso corporal; SF = Solução fisiológica; DOM = Domperidona; SV = Solução veículo; h = horas.

**TABELA 3**

Média e desvio padrão (média  $\pm$  dp) da porcentagem de ovócitos, com as respectivas situações de seus núcleos, por biópsia, obtidos em 5 repetições do experimento realizado na UPG, no período de 27/11 a 01/12/89, em fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*)

TRATAMENTO	1ª BIÓPSIA			2ª BIÓPSIA			3ª BIÓPSIA					
	NC	NM	NP	MNR	NC	NM	NP	MNR	NC	NM	NP	MNR
EHC	54,6 $\pm$ 18,8	45,4 $\pm$ 18,8	—	—	29,8 $\pm$ 16,2	54,2 $\pm$ 15,6	16 $\pm$ 21	—	3,7 $\pm$ 5,9	1,8 $\pm$ 4,1	18,2 $\pm$ 26	76,3 $\pm$ 30,5
LHRH	60,4 $\pm$ 18,6	39,6 $\pm$ 18,6	—	—	27,1 $\pm$ 13,5	46 $\pm$ 11,8	20,5 $\pm$ 22,6	6,4 $\pm$ 14,2	1,8 $\pm$ 4,1	3,4 $\pm$ 3,6	11,9 $\pm$ 6,2	82,8 $\pm$ 12,5
LHRH+DOM	58,5 $\pm$ 10	41,5 $\pm$ 10	—	—	31 $\pm$ 9,9	55,1 $\pm$ 19,1	11,3 $\pm$ 7,7	2,7 $\pm$ 6	12,1 $\pm$ 14,2	3,4 $\pm$ 4,2	18,7 $\pm$ 20,8	65,9 $\pm$ 35,9

dp = desvio padrão; EHC = Extrato bruto de hipófise de carpa; LHRH = Hormônio liberador de hormônio luteinizante; LHRH+DOM = Hormônio liberador de hormônio luteinizante + Domperidona; NC = Núcleo central; NM = Núcleo migrando; NP = Núcleo periférico; e MNR = Membrana nuclear rompida.

TABELA 4

Média e desvio padrão (média  $\pm$  dp) da porcentagem de ovócitos, com as respectivas situações de seus núcleos, por biópsia, obtidos em 5 repetições do experimento realizado no CEPTA, no período de 7 a 14/12/89, em fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*)

TRATAMENTO	1ª BIÓPSIA					2ª BIÓPSIA					3ª BIÓPSIA							
	NC	NM	NP	MNR	NC	NC	NM	NP	MNR	NC	NC	NM	NP	MNR	NC	NC	NM	NP
EHC	38,4 $\pm$ 21,6	41,6 $\pm$ 14,9	14,6 $\pm$ 5,5	5,4 $\pm$ 8,3	15,3 $\pm$ 14,9	57,2 $\pm$ 25,7	23,9 $\pm$ 25,4	3,6 $\pm$ 3,1	1,6 $\pm$ 1	1,3 $\pm$ 2,1	3,4 $\pm$ 4,1	93,7 $\pm$ 6,5						
LHRH	26,8 $\pm$ 15,7	51,5 $\pm$ 8,3	19 $\pm$ 6,6	2,7 $\pm$ 3,8	16,6 $\pm$ 9,8	66,2 $\pm$ 20	12,3 $\pm$ 11,2	4,8 $\pm$ 5,8	10,7 $\pm$ 12,6	44,2 $\pm$ 24,6	37,1 $\pm$ 26	8 $\pm$ 9,6						
LHRH+DOM	32,3 $\pm$ 15,4	39,7 $\pm$ 6,8	22,1 $\pm$ 7,8	5,9 $\pm$ 9,9	17,2 $\pm$ 11,3	58 $\pm$ 23,6	19,3 $\pm$ 23,7	5,5 $\pm$ 6,6	10,7 $\pm$ 9,6	35,6 $\pm$ 23,4	41,7 $\pm$ 21,4	12 $\pm$ 12,4						
S. F.	30,3 $\pm$ 20	45,4 $\pm$ 10	16,9 $\pm$ 5,7	7,4 $\pm$ 9,5	23,8 $\pm$ 17,8	57,1 $\pm$ 18,7	10,5 $\pm$ 7,3	8,6 $\pm$ 11,4	18,4 $\pm$ 18,1	47,1 $\pm$ 11,8	24,6 $\pm$ 12,2	9,9 $\pm$ 10,3						

dp = desvio padrão; EHC = Extrato bruto de hipófise de carpa; LHRH = Hormônio liberador de hormônio luteinizante; LHRH+DOM = Hormônio liberador de hormônio luteinizante + Domperidona; S.F. = Solução fisiológica; NC = Núcleo central; NM = Núcleo migrando; NP = Núcleo periférico; e MNR = Membrana nuclear rompida.

TABELA 5

Peso (g), tempo para extrusão (h-g) e taxa de fecundação (%) das ovas liberadas pelas fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*) submetidas às diversas soluções, na UPG, por bloco de repetição, durante o período de 27/11 a 01/12/89.

SOLUÇÃO	EHC			LHRH			LHRH+DOM		
	BLOCO	P (g)	T (h-g)	TF (%)	P (g)	T (h-g)	TF (%)	P (g)	T (h-g)
1	177	336	0	344	303	51,3	297	309	0
2	—	—	—	107	338	0	97	299	6,6
3	—	—	—	—	—	—	76	339	29,5
4	—	—	—	20	425	0	23	420	0
5	112	296	4,4	—	—	—	103	329	81,2

EHC = hipófise de carpa comum; LHRH = hormônio liberador de hormônio luteinizante; LHRH+DOM = hormônio liberador de hormônio luteinizante + domperidona; P = peso; T = número de horas-grau (h-g) decorrido entre a 2ª aplicação de cada solução e a extrusão; TF = taxa de fecundação.

TABELA 6

Peso (g), tempo para extrusão (h-g) e taxa de fecundação (%) das ovas liberadas pelas fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*) submetidas às quatro soluções no CEPTA, por bloco de repetição, no período de 7 a 14/12/89.

SOLUÇÃO	EHC			LHRH			LHRH+DOM			SF			
	BLOCO	P (g)	T (h-g)	TF (%)	P (g)	T (h-g)	TF (%)	P (g)	T (h-g)	TF (%)	P (g)	T (h-g)	TF (%)
1	88	293	16,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	106	300	22,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	70	304	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	98	352	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	102	278	30,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

EHC = hipófise de carpa comum; LHRH = hormônio liberador de hormônio luteinizante; LHRH+DOM = hormônio liberador de hormônio luteinizante + domperidona; SF = solução fisiológica; P = peso; T = número de horas-grau (h-g) decorrido entre a 2ª aplicação de cada solução e a extrusão; TF = taxa de fecundação.

TABELA 7

Resultados das induções obtidas em fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*) nos experimentos realizados na Unidade de Piscicultura do Gortuba - UPG, no período de 27/11 a 01/12/89

DISCRIMINAÇÃO	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES	MÉDIA $\pm$ dp	AMPLITUDE DE VARIAÇÃO
Peso corporal (kg)			
• Fêmeas	15	3,5 $\pm$ 0,6	2,5 — 4,7
• Machos	21	2,4 $\pm$ 0,3	1,7 — 2,8
Temperatura da água (°C)	—	27,1 $\pm$ 1,5	25,1 — 28,7
Horas-grau à extrusão			
• EHC	2	316,0 $\pm$ 28,5	295,8 — 336,1
• LHRH	3	354,8 $\pm$ 62,2	302,6 — 423,6
• LHRH+DOM	5	339,9 $\pm$ 49,2	299,4 — 423,3
Peso da ova (g), por tratamento			
• EHC	2	144,5 $\pm$ 46,0	112 — 177
• LHRH	3	157,0 $\pm$ 167,7	20 — 344
• LHRH+DOM	5	119,2 $\pm$ 104,3	23 — 297
Taxa de fecundação (%)			
• EHC	1	4,4	—
• LHRH	1	51,3	—
• LHRH+DOM	3	39,1 $\pm$ 38,2	6,6 — 81,2

dp = desvio padrão; EHC = Hipófise de carpa comum; LHRH = hormônio liberador de hormônio luteinizante; LHRH + DOM = hormônio liberador de hormônio luteinizante + domperidona.

TABELA 8

Resultados das induções obtidas em fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*) nos experimentos realizados no Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura - CEPTA, no período de 7 a 14/12/89.

DISCRIMINAÇÃO	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES	MÉDIA $\pm$ dp	AMPLITUDE DE VARIAÇÃO
Peso corporal (kg)			
• Fêmeas	20	2,1 $\pm$ 0,2	1,8 — 2,7
• Machos	25	1,5 $\pm$ 0,4	0,7 — 2,6
Temperatura da água (°C)	—	28,3 $\pm$ 0,9	25,7 — 29,0
Horas-grau à extrusão			
• EHC	5	294,4 $\pm$ 9,8	278,5 — 304,2
• LHRH,LHRH+DOM e SF	—	—	—
Peso da ova (g), por tratamento			
• EHC	5	92,8 $\pm$ 14,4	70 — 106
• LHRH,LHRH+DOM e SF	—	—	—
Taxa de fecundação (%)			
• EHC	3	23,4 $\pm$ 7	16,8 — 30,7

dp = desvio padrão; EHC = hipófise de carpa comum; LHRH = hormônio liberador de hormônio luteinizante; LHRH + DOM = hormônio liberador de hormônio luteinizante + domperidona.

TABELA 9

Medida do diâmetro dos ovócitos ( $\mu\text{m}$ ), fixados em solução salina formolizada a 1 %, obtidos das fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*), no experimento realizado no Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura - CEPTA, no período de 7 a 14/12/89.

DISCRIMINAÇÃO	CV (%)	NÚMERO DE REPETIÇÕES	MÉDIA $\pm$ dp	AMPLITUDE DE VARIAÇÃO
<b>EHC</b>				
• À 1ª biópsia	8	5	1.000,0 $\pm$ 79,8	750 — 1.150
• À 2ª biópsia	6,7	5	1.064,0 $\pm$ 71,5	875 — 1.250
• À 3ª biópsia	6,9	5	1.095,0 $\pm$ 75,5	900 — 1.250
<b>LHRH</b>				
• À 1ª biópsia	8,4	5	1.035,2 $\pm$ 87,0	750 — 1.250
• À 2ª biópsia	5,8	5	1.069,5 $\pm$ 61,5	900 — 1.200
• À 3ª biópsia	6	5	1.076,5 $\pm$ 64,2	900 — 1.250
<b>LHRH+DOM</b>				
• À 1ª biópsia	7,1	5	1.001,0 $\pm$ 71,2	750 — 1.150
• À 2ª biópsia	6,7	5	1.020,8 $\pm$ 68,8	875 — 1.250
• À 3ª biópsia	5,6	5	1.043,5 $\pm$ 58,2	875 — 1.200
<b>SF</b>				
• À 1ª biópsia	7,7	5	1.008,5 $\pm$ 78,0	875 — 1.175
• À 2ª biópsia	7,4	5	1.048,5 $\pm$ 77,2	825 — 1.225
• À 3ª biópsia	7	5	1.074,5 $\pm$ 74,8	850 — 1.250

CV = Coeficiente de variação; dp = desvio padrão; EHC = hipófise de carpa comum; LHRH = Hormônio liberador de hormônio luteinizante; LHRH + DOM = Hormônio liberador de hormônio luteizante + domperidona; SF = Solução fisiológica.

**TABELA 10**

Análise de variância para experimento bifatorial (soluções e biópsias) do experimento realizado na UPG no período de 27/11 a 01/12/89, em fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*), relacionada à obtenção de maturação ovocitária final (MNR).

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F ( $\alpha=5\%$ )
Blocos (repetições)	4	1.225,38	306,34	2,11
Fator A (soluções)	2	148,76	74,38	0,51
Fator B (biópsias)	2	33.974,3	16.987,15	117,06 (*)
Interação (A x B)	4	314,7	78,68	0,54
Erro	32	4.643,87	145,12	—
<b>TOTAL</b>	<b>44</b>	<b>40.307,0</b>	<b>—</b>	<b>—</b>

MNR = Membrana nuclear do ovócito rompida; GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = relativo ao teste F; (\*) Significativo; coeficiente de variação = 50,3%.

**TABELA 11**

Análise de variância para experimento bifatorial (soluções e biópsias) do experimento realizado no CEPTA no período de 7 a 14/12/89, em fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*), relacionada à obtenção de maturação ovocitária final (MNR).

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F ( $\alpha=5\%$ )
Blocos (repetições)	4	2.660,24	665,06	15,9 (*)
Fator A (soluções)	3	4.458,25	1486,08	35,,73 (*)
Fator B (biópsias)	2	5.158,92	2.579,46	66,02 (*)
Interação (A x B)	6	9.659,27	1609,88	38,71 (*)
Erro	44	1.829,83	41,59	—
<b>T O T A L</b>	<b>59</b>	<b>23.766,51</b>	<b>—</b>	<b>—</b>

MNR = Membrana nuclear do ovócito rompida; GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = relativo ao teste F; (\*) Significativo; Coeficiente de variação = 36,5 %.

**TABELA 12**

Análise de variância para experimento bifatorial (soluções e biópsias) do experimento realizado no CEPTA no período de 7 a 14/12/89, em fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*), relacionada ao aumento do diâmetro dos ovócitos.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F ( $\alpha=5\%$ )
Blocos (repetições)	4	3,43	0,86	0,32
Fator A (soluções)	3	16,76	5,59	2,06
Fator B (biópsias)	2	68,56	34,28	12,6 (*)
Interação (A x B)	6	10,97	1,83	0,67
Erro	44	119,53	2,72	—
<b>TOTAL</b>	<b>59</b>	<b>219,25</b>	<b>—</b>	<b>—</b>

GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = relativo ao teste F; (\*) Significativo; Coeficiente de variação = 3,9 %.

TABELA 13

Temperatura (°C) média da água dos tanques da UPG e do CEPTA, pluviosidade (mm e dias/mês) e fotoperíodo (hora-luz/dia) para os municípios de Porteirinha/MG (15° 43'S e 43° 15'W) e Pirassununga/SP (22° 02'S e 47° 30'W), no período de junho a dezembro de 1989.

Mês	Temperatura média (°C)		Pluviosidade (mm; dias/mês)		Fotoperíodo (h-luz/dia) (1)	
	UPG	CEPTA (2)	UPG	CEPTA (3)	UPG	CEPTA
Junho	21,9	17,5	25,6	13,8	6	10:48
Julho	21,2	14,5	4,0	72,7	4	10:58
Agosto	22,8	18,3	0,0	21,2	4	11:28
Setembro	24,9	21,4	35,5	70,1	12	12:08
Outubro	25,8	22,5	37,2	55,8	3	12:43
Novembro	27,1	24,8	201,4	185,7	16	13:14
Dezembro	24,3	27,0	422,9	198,0	9	13:28

(1) ANUÁRIO OBSERVATÓRIO NACIONAL (1975)

(2) Até o dia 10/12/89

(3) Academia da Força Aérea (Pirassununga/SP)

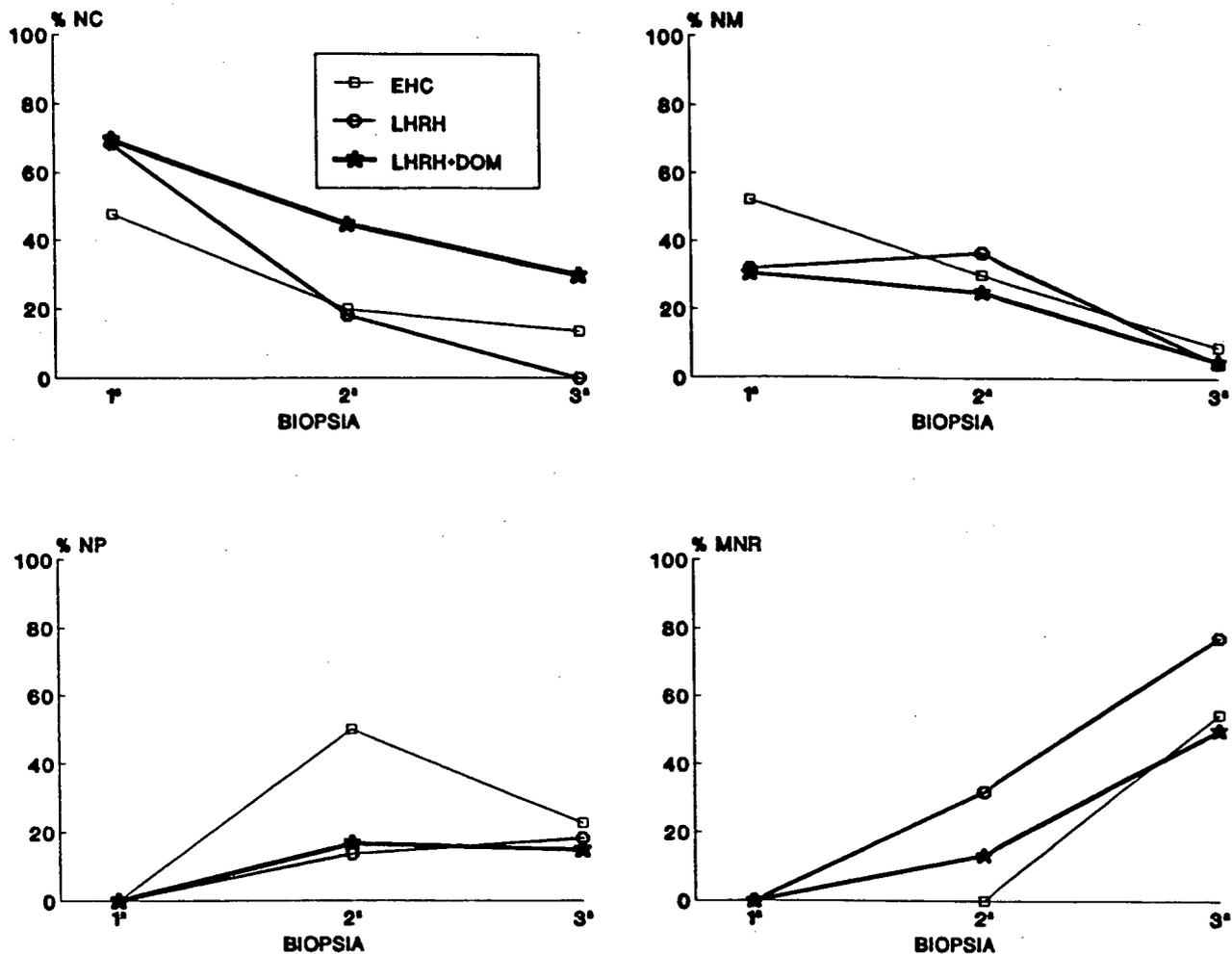


Figura 1 - Frequência (%) de ovócitos de pacu (*P. mesopotamicus*) nos 4 diferentes estádios de maturação ovocitária (NC=núcleo central; NM = núcleo migrando; NP = núcleo periférico; MNR = membrana nuclear rompida), no primeiro bloco do experimento realizado na UPG, no período de 27 a 28/11/89, durante as 3 biópsias, sendo as 2 primeiras exatamente antes das respectivas 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> aplicações das soluções (EHC = hipófise de carpa comum; LHRH = hormônio liberador de hormônio luteinizante; LHRH + DOM = hormônio liberador de hormônio luteinizante + Domperidona) e a terceira a 300 horas-grau após a 2<sup>a</sup> aplicação.

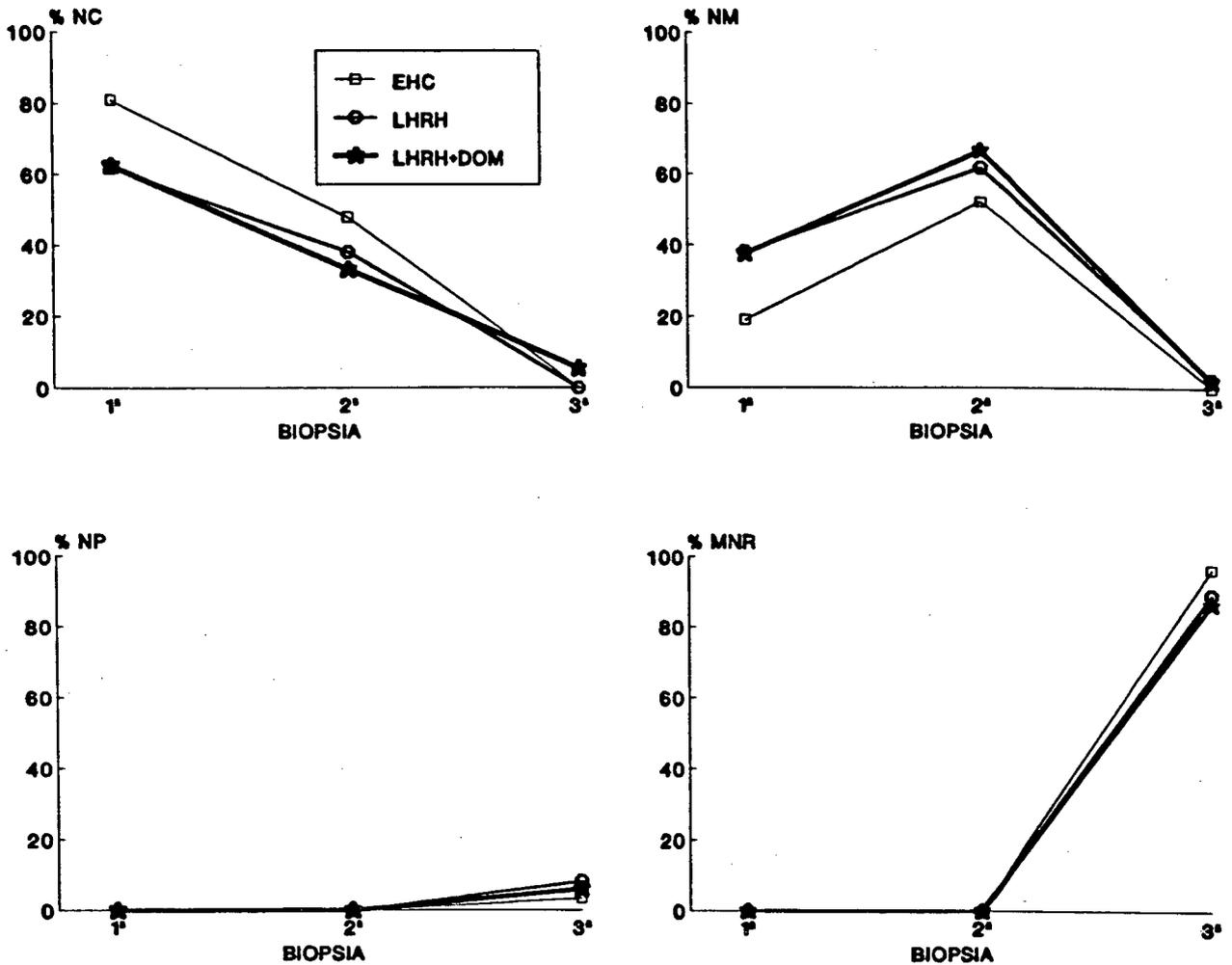


Figura 2 - Frequência (%) de ovócitos de pacu (*P. mesopotamicus*) nos 4 diferentes estádios de maturação ovocitária (NC=núcleo central; NM = núcleo migrando; NP = núcleo periférico; MNR = membrana nuclear rompida), no terceiro bloco do experimento realizado na UPG, no período de 28 a 29/11/89, durante as 3 biópsias, sendo as 2 primeiras exatamente antes das respectivas 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> aplicações das soluções (EHC = hipófise de carpa comum; LHRH = hormônio liberador de hormônio luteinizante; LHRH + DOM = hormônio liberador de hormônio luteinizante + Domperidona) e a terceira a 300 horas-grau após a 2<sup>a</sup> aplicação.

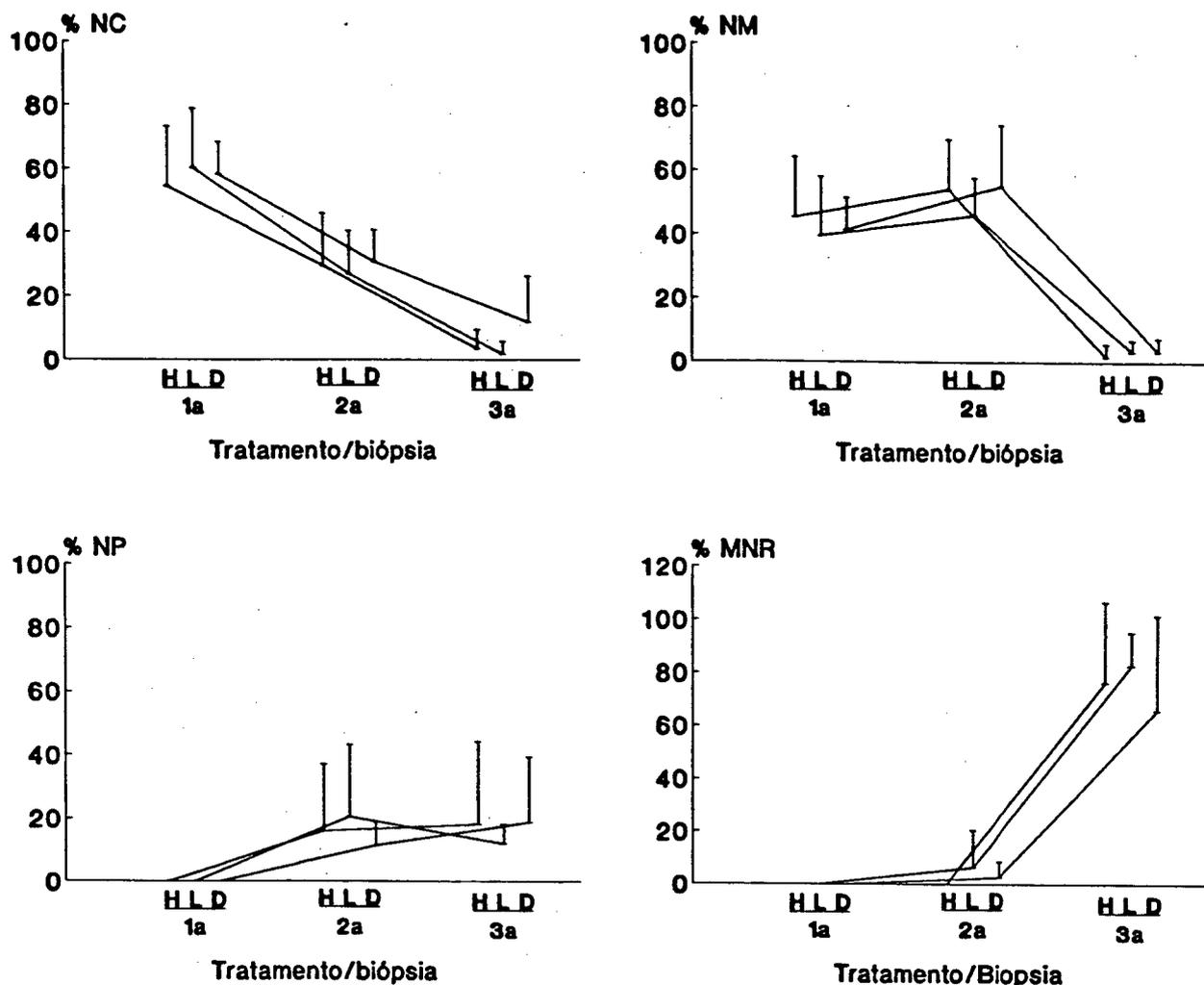


Figura 3 - Frequência (%) média  $\pm$  desvio padrão de ovócitos de pacu (*P. mesopotamicus*) dos 5 blocos do experimento realizado na UPG, no período de 27/11 a 01/12/89, nos 4 diferentes estádios de maturação ovocitária (NC = núcleo central; NM = núcleo migrando; NP = núcleo periférico; MNR = membrana nuclear rompida), durante as 3 biópsias, sendo as 2 primeiras exatamente antes das respectivas 1ª e 2ª aplicações das soluções (H = hipófise de carpa comum; L = hormônio liberador de hormônio luteinizante; D = hormônio liberador de hormônio luteinizante + Domperidona) e a terceira biópsia a 300 horas-grau após a 2ª aplicação.

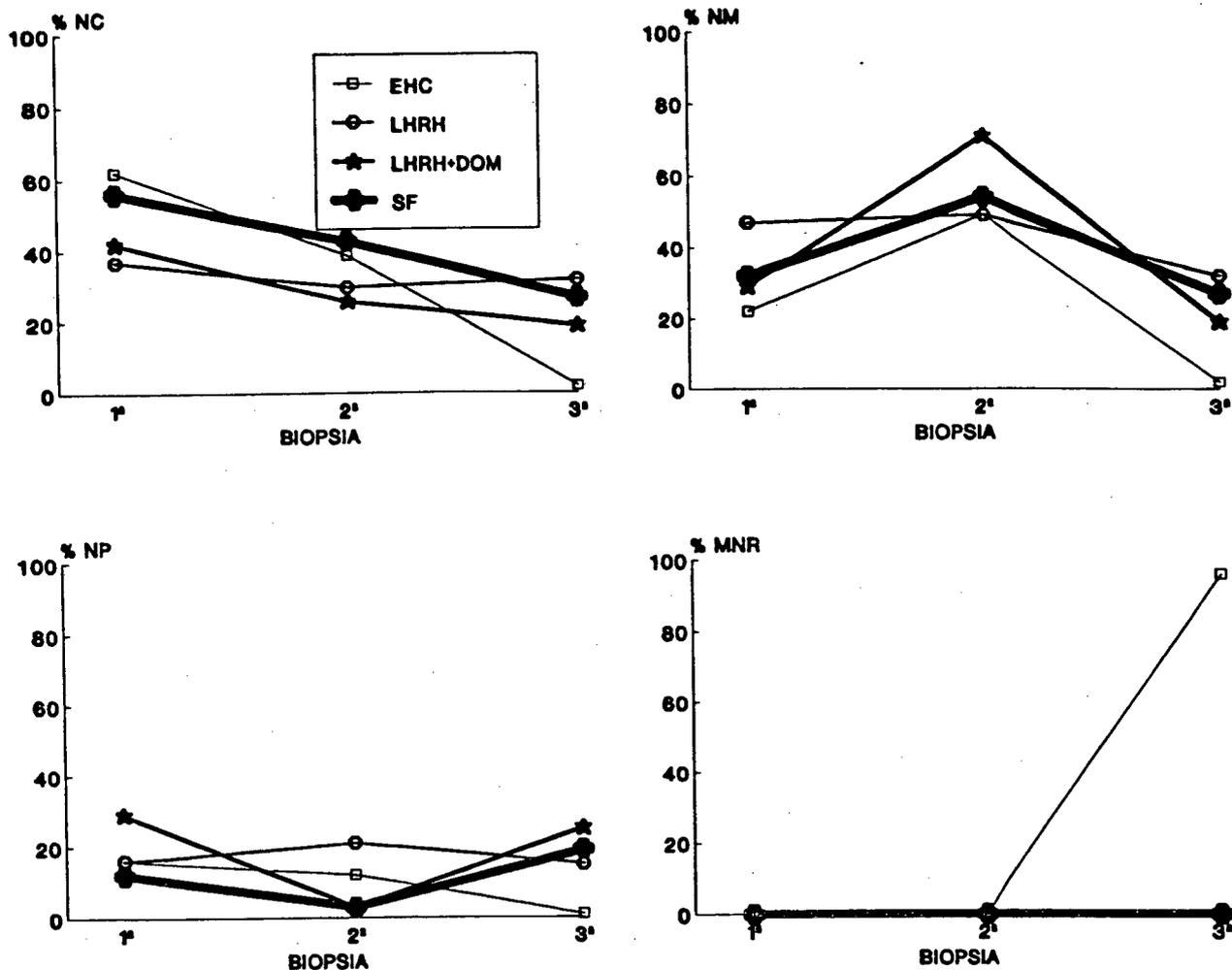


Figura 4 - Frequência (%) de ovócitos de pacu (*P. mesopotamicus*) nos 4 diferentes estádios de maturação ovocitária (NC=núcleo central; NM =núcleo migrando; NP =núcleo periférico; MNR = membrana nuclear rompida), no primeiro bloco do experimento realizado no CEPTA, no período de 07 a 08/12/89, durante as 3 biópsias, sendo as 2 primeiras exatamente antes das respectivas 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> aplicações das soluções (EHC =hipófise de carpa comum; LHRH = hormônio liberador de hormônio luteinizante; LHRH + DOM = hormônio liberador de hormônio luteinizante + Domperidona; SF = solução fisiológica) e a terceira após 300 horas-grau da 2<sup>a</sup> aplicação.

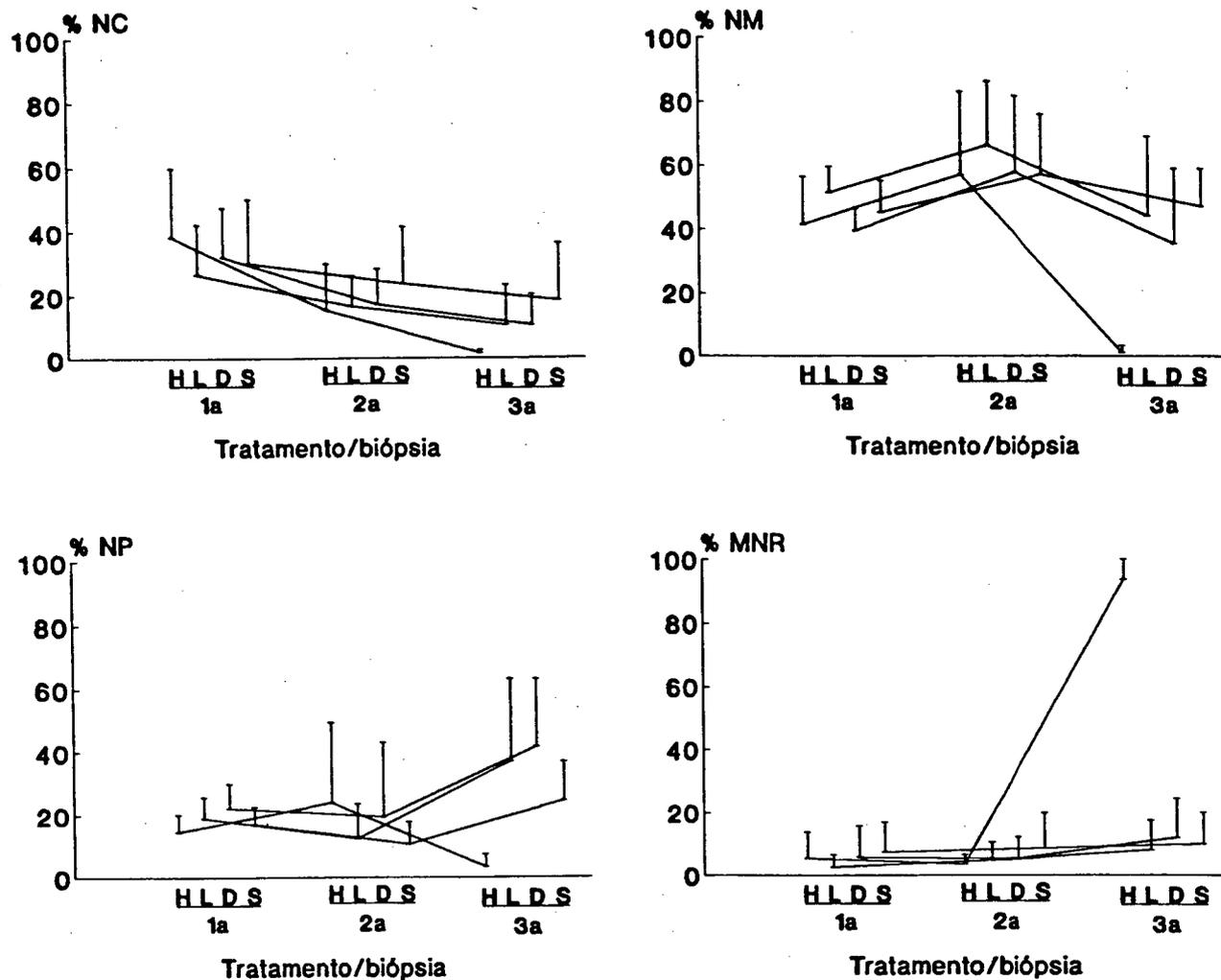


Figura 5 - Frequência (%) média  $\pm$  desvio padrão de ovócitos de pacu (*P. mesopotamicus*) dos 5 blocos do experimento realizado no CEPTA, no período de 07 a 13/12/89, nos 4 diferentes estádios de maturação ovocitária (NC =núcleo central; NM =núcleo migrando; NP = núcleo periférico; MNR = membrana nuclear rompida), coletados durante as 3 biópsias, sendo as 2 primeiras exatamente antes das respectivas 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> aplicações das soluções (H = hipófise de carpa comum; L =hormônio liberador de hormônio luteinizante; D = hormônio liberador de hormônio luteinizante + Domperidona; S = solução fisiológica) e a terceira biópsia a 300 horas-grau após a 2<sup>a</sup> aplicação.

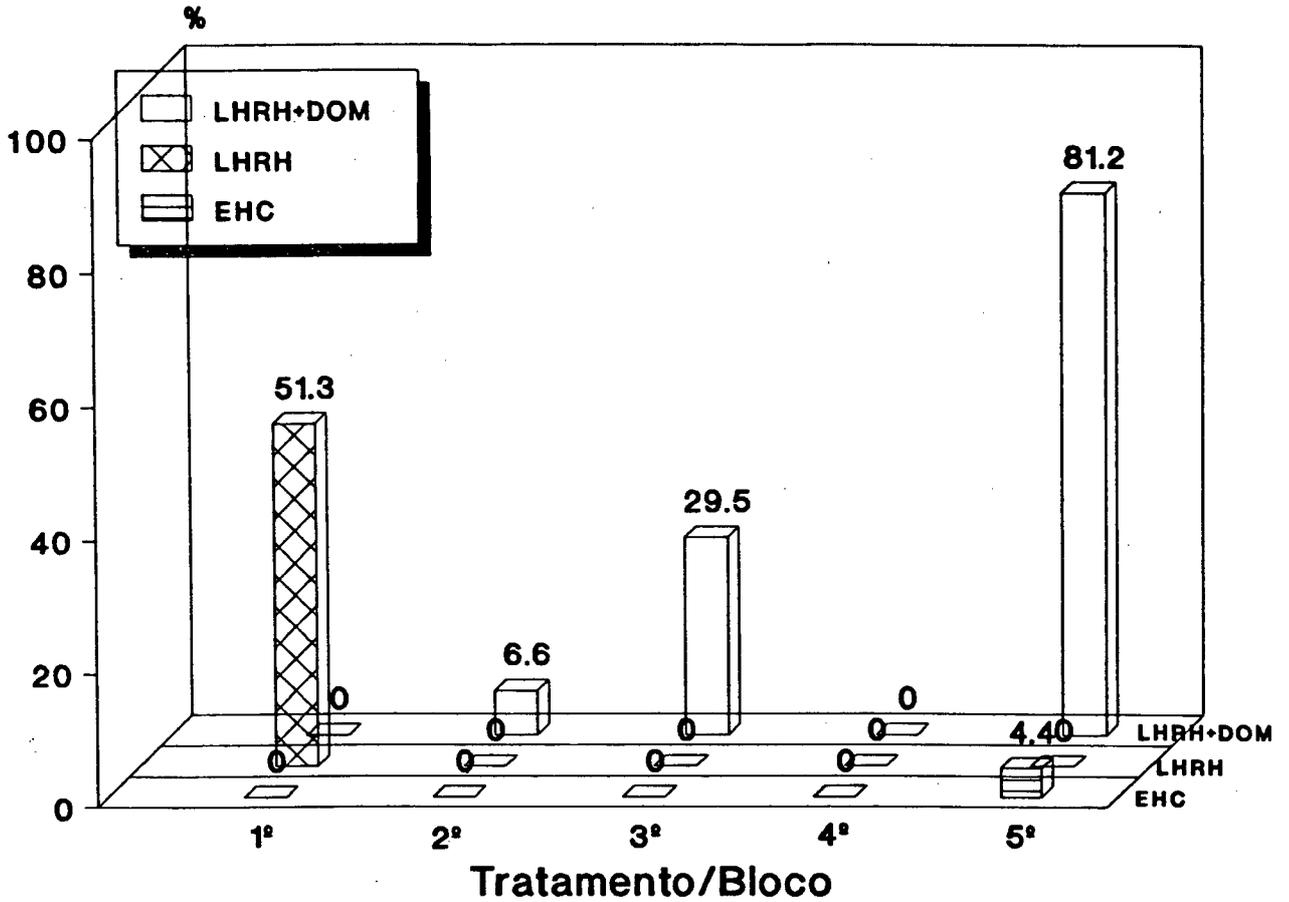


Figura 6 - Fecundação (%) dos ovos de pacu (*P. mesopotamicus*) extrusados nos 5 blocos do experimento realizado na UPG, no período de 27/11 a 01/12/89, por solução (EHC = hipófise de carpa comum; LHRH = hormônio liberador de hormônio luteinizante; LHRH+DOM = hormônio liberador de hormônio luteinizante + Domperidona)

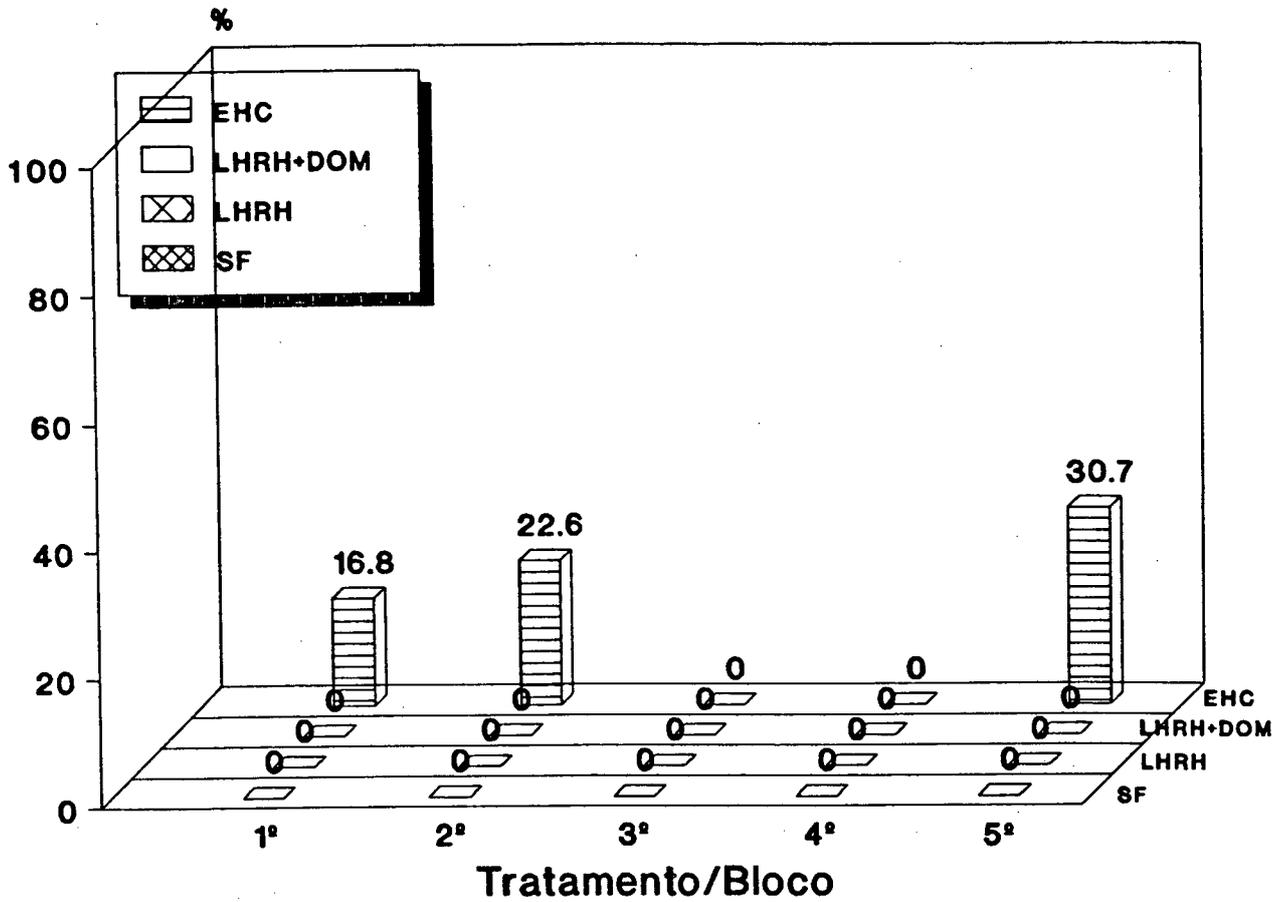


Figura 7 - Fecundação (%) dos ovos de pacu (*P. mesopotamicus*) extrusados nos 5 blocos do experimento realizado no CEPTA, no período de 07 a 13/12/89, por solução (EHC = hipófise de carpa comum; LHRH = hormônio liberador de hormônio luteinizante; LHRH+DOM = hormônio liberador de hormônio luteinizante + Domperidona; SF = solução fisiológica).

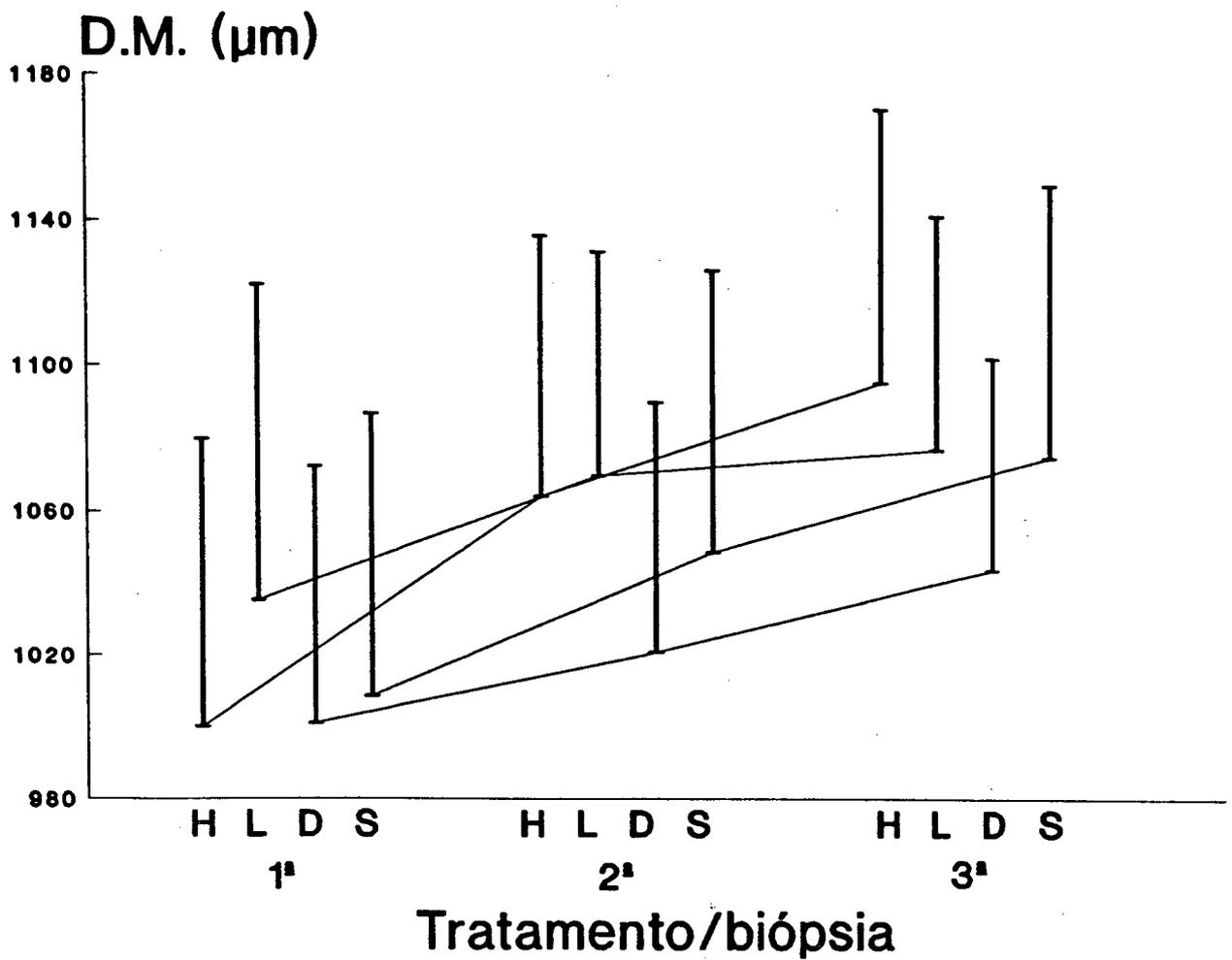


Figura 8 - Diâmetro médio (D.M.), em  $\mu\text{m}$ , e desvio padrão ( $x \pm dp$ ), às 3 biópsias, dos ovócitos de fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*) submetidas às 4 soluções (H=hipófise de carpa comum; L = hormônio liberador de hormônio luteinizante; D =hormônio liberador de hormônio luteinizante + Domperidona; S = solução fisiológica) no experimento realizado no CEPTA, no período de 07 a 13/12/89.

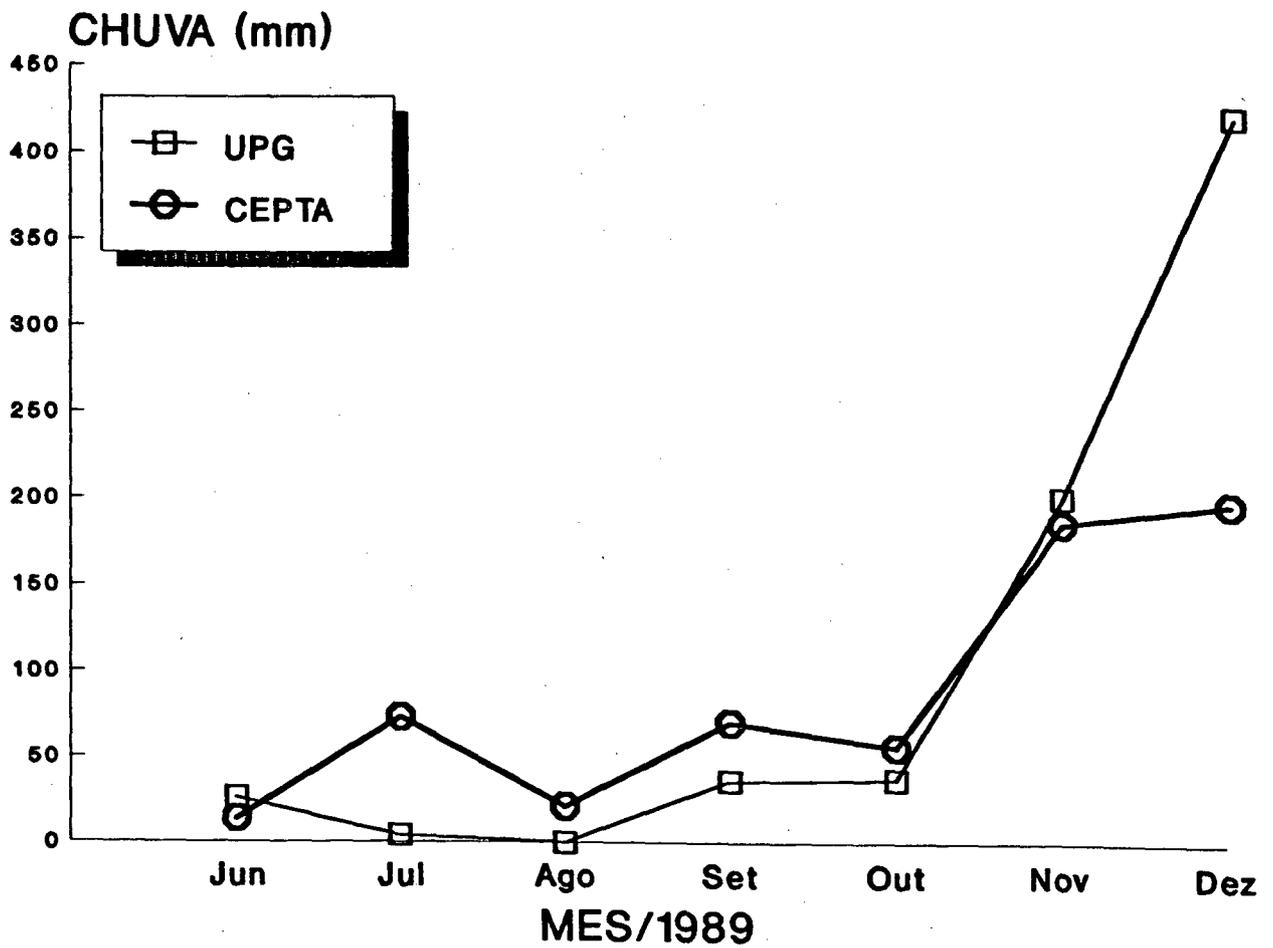


Figura 9 - Chuvas (mm) ocorridas na UPG e no CEPTA no período de junho a dezembro de 1989.

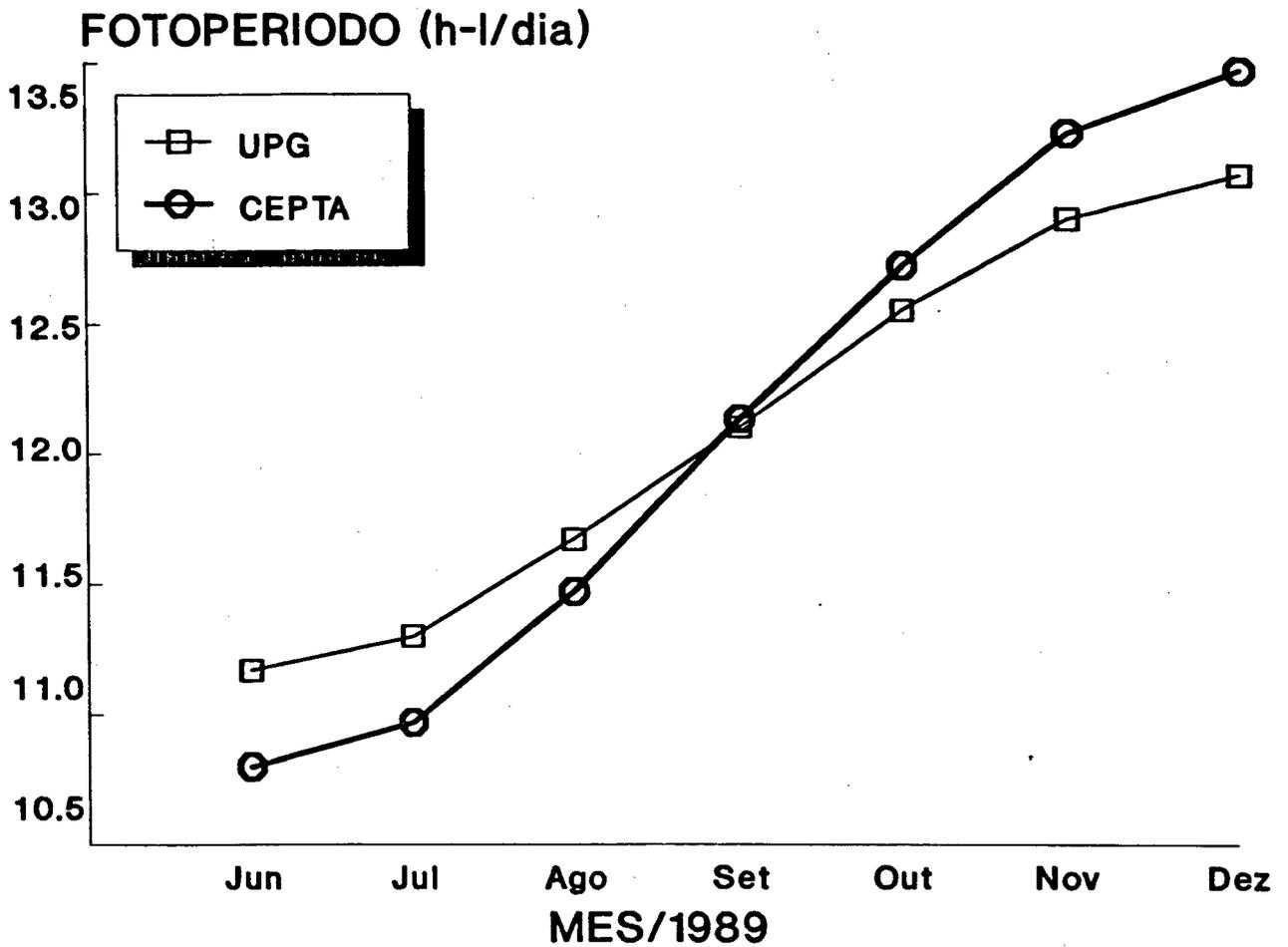


Figura 10 - Fotoperíodo (horas de luz/dia) para os municípios de Porteirinha, MG ( $15^{\circ}43'S$  e  $43^{\circ}15'W$ ) e Pirassununga, SP ( $22^{\circ}02'S$  e  $47^{\circ}30'W$ ), onde se localizam, respectivamente, a UPG e o CEPTA, no período de junho a dezembro de 1989.

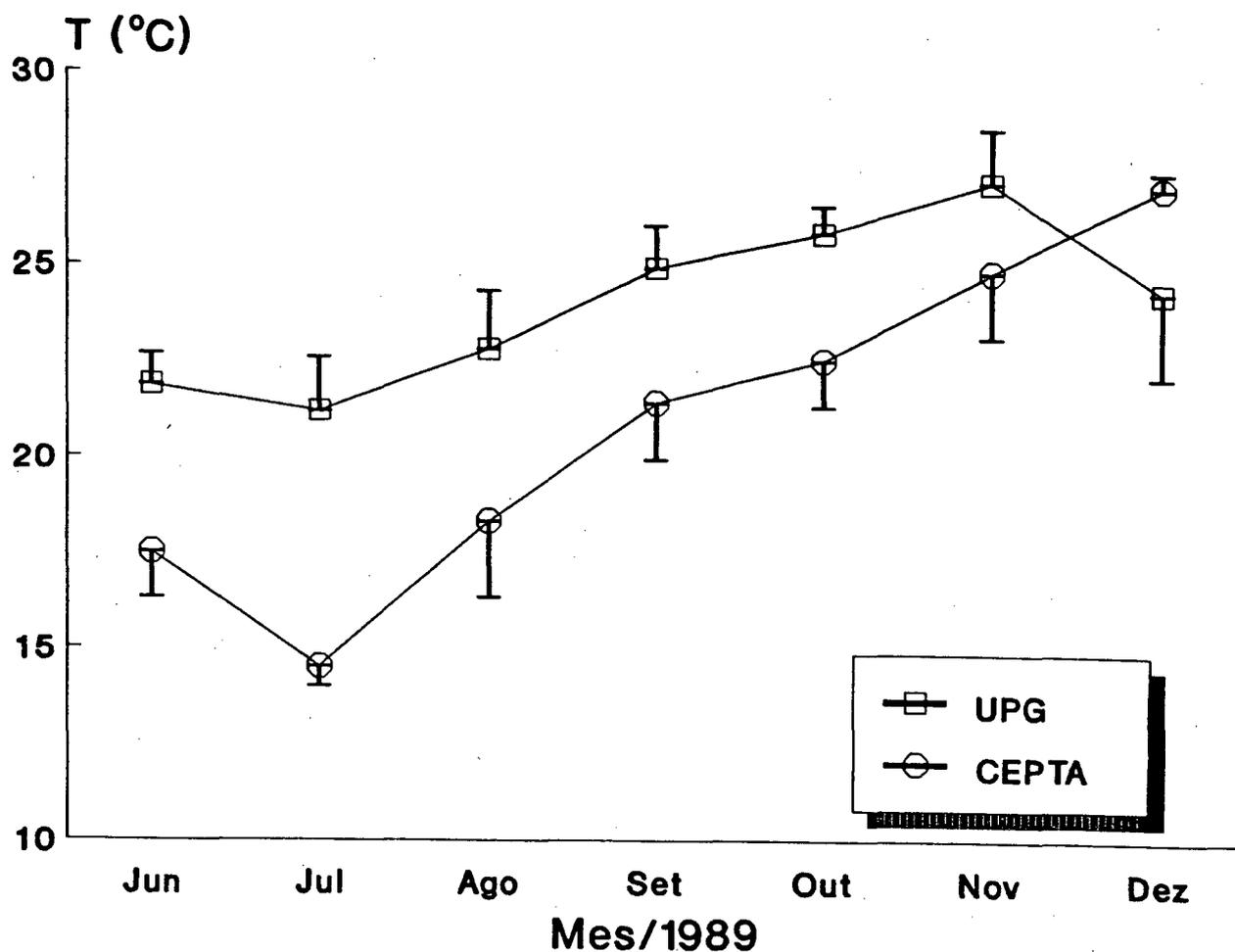


Figura 11 - Temperatura média (°C) e desvio padrão ( $T \pm dp$ ) da água dos tanques da UPG e do CEPTA onde estavam estocados os plantéis de reprodutores utilizados neste experimento, no período de junho a dezembro de 1989, por volta das 9:00 horas.

**Propagacao Artificial / Protocolo de Acompanhamento**

<b>No de controle:</b>	<b>LOCAL:</b>
<b>Especie:</b>	<b>DATA:</b>

Femea			1a. DOSE							2a. DOSE						
			APLIC. A. DA.	A. DA. _ng/kg	SU _nl/kg	APLIC. HORA.	LRRH _ug/kg	EHC _ng/kg	SF _nl/kg	APLIC. A. DA.	A. DA. _ng/kg	SU _nl/kg	APLIC. HORA.	LRRH _ug/kg	EHC _ng/kg	SF _nl/kg
No	MARCA	PESO	HORA	ng/und.	nl/und.	HORA	ug/und.	ng/und.	nl/und.	HORA	ng/und.	nl/und.	HORA	ug/und.	ng/und.	nl/und.
1																
2																
3																
4																
5																

Macho			Femea			FERTILIZACAO			INCUBACAO		HORA	°C	HORAS GRAU
No.	MARCA	PESO	APLIC. HORA	EHC _ng/und.	SF _nl/und.	No.	HORA DESOVA	BACIA		SEMEM			
			HORA	ng/und.	nl/und.			No.	PESO (G) SECA	PESO (G) OVA	nl	No.	%
1													
2													
3													
4													
5													

A. DA. - Anagonista de Dopamina  
 SU - Solucao Veiculo para o A. DA.  
 EHC - Extrato de Nipofise de Carpa  
 SF - Solucao Fisologica

Apêndice A: Protocolo de acompanhamento dos blocos dos experimentos realizados na UPG e no CEPTA, para anotações dos pesos corporais de machos e fêmeas e respectivas marcas; hora de aplicação, tamanho e número de doses das soluções ministradas; temperatura da água e evolução das unidades térmicas acumuladas (horas-grau); fêmeas que desovaram e hora da desova; peso da ova coletada e volume de sêmen utilizado por bacia; e taxa de fecundação por incubadora.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA ROCHA, R.C.G., CECCARELLI, P.S., GASPAR, L.A. & BERNARDINO, G. O banco de hipófises de curimatá, *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1847, no CEPTA - método de extração e preservação. B. Téc. CEPTA, Pirassununga, 2: p.1-12, 1989;
- ALMEIDA TOLEDO, L.F., FORESTI, F., RAMOS S.M. *et al.* Estudos citogenéticos de híbridos entre fêmeas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e machos de tambaqui (*Colossoma macropomum*). B. Téc. CEPTA, Pirassununga, 1 (2): p.11-17, 1988;
- ALMENDRAS, J.M., DUENAS, C., NACARIO, J. *et al.* Sustained hormone release. III. Use of gonadotropin releasing hormone analogues to induce multiple spawnings in sea bass, *Lates calcarifer*. Aquaculture, 74: p.97-111, 1988;
- ALVES, M. S. O. & GODINHO, H. P. Estádios do desenvolvimento embrionário do pacu, *Colossoma mitrei* (Berg, 1895). In: Cong. Bras. Zool., 1987. Resumos... 1987. p. 159;
- ARRUDA, H.V. Considerações gerais sobre transformações de dados experimentais. In: Reunião Internacional de Biometria, 1979. Anais... 1979. p.329-338;

- AZEVEDO, P. & CANALE, L. A hipótese e sua ação nas gônadas dos peixes neotrópicos. Arch. Inst. Biológico, 9: p.165-186, 1938;
- BAGGERMAN, B. Photoperiodic and endogenous control of the annual reproductive cycle in teleost fishes. In: Environmental Physiology of Fishes., M. A. Ali., p.533-567, 1979;
- BALL, J. N. Reproduction in female bony fishes. Symp. Zool. Soc. London, 1: p.105-135, 1960 *apud* WALLACE, R. A. & SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Amer. Zool., 21: p.325-343, 1981;
- BARR, W. A. Patterns of ovarian activity. In: Perspectives in Endocrinology, E. J. W. Barrington & C. B. Jorgensen, New York, Academic Press, p.164, 1968 *apud* GURAYA, S. S. Follicular atresia. Indian Natl. Sc. Acad. Proceedings... 39, 1973. p.311-332;
- BERNARDINO, G., ALCÂNTARA ROCHA, C.G. & ORMANEZI, R. Observações preliminares sobre o ciclo reprodutivo do *Collossoma mitrei* e relações com fatores abióticos. In: Síntese dos Trabalhos com Espécies do Gênero Collossoma (Projeto Aquicultura / Brasil 3-p-76-00071-CIID). Pirassununga, CEPTA, 1986, p.14 *apud* ROMAGOSA, E. Mudanças morfológicas (microscopia de luz e eletrônica) das gônadas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) durante o ciclo reprodutivo, em condições de confinamento. Rio Claro: UNESP, 1991, 177p. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 1991;
- BERNARDINO, G., ALCÂNTARA ROCHA, R. C. G. & SENHORINI, J. A. Procedimentos para a reprodução induzida e alevinagem do tambaqui *Collossoma macropomum* e pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: Simp. Lat. Americ., 6, e Simp. Bras. Aquic., 5, 1988, Florianópolis. Resumos... 1988, p. 193;

- BERNARDINO, G. & FERRARI, V.A. Efeitos do uso de ração comercial no desempenho do pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (1887) em cativeiro. B. Téc. CEPTA, Pirassununga, 2: p.19-33, 1989;
- BIENIARZ, K. & EPLER, P. Preliminary results of the *in vivo* studies on ovarian resorption in carp (*Cyprinus carpio*, L.). J. Fish Biol. 8: p.449-451, 1976;
- BIENIARZ, K., EPLER, P., THUY, L. N. & KOGUT, E. Changes in the ovaries of adult carp. Aquaculture, 17: p.45-68, 1979;
- BIENIARZ, K., EPLER, P., SOKOLOWSKA, M. *et al.* The effects of [D-ARG6, TRP7, LEU8, PRO9-NET]-LHRH (s-GnRH-A), [ALA6,PRO9-NET] -LHRH (LRH-A) and pimozide on the blood m-GtH levels and ovulation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Pol. Arch. Hydrobiol., 36 (3): p.395-406, 1989;
- BILLARD, R. La gamétogenèse, le cycle sexuel et le contrôle de la reproduction chez les poissons téléostéens. Bull. Fr. Pisc., 273: p.117-136, 1979;
- BILLARD, R. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. Aquaculture, 100: p.263-298, 1992;
- BILLARD, R., BIENIARZ, K., PETER, R. E. Effects of LHRH and LHRH-A on plasma GtH levels and maturation/ovulation in the common carp, *Cyprinus carpio*, kept under various environmental conditions. Aquaculture, 41: p.245-254, 1984;
- BILLARD, R., BIENIARZ, K., POPEK, W. Stimulation of gonadotropin secretion and spermiation in carp by pimozide-LHRHa treatment: Effects of dose and time of day.

Aquaculture, 62: p.161-170, 1987;

BILLARD, R. & PETER, R. E. Gonadotropin release after implantation of anti-estrogens in the pituitary and hypothalamus of goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol. 32: p.213- 220, 1977;

BRETON, B., JALABERT, B., BIENIARZ, K. et al. Effects of synthetic LH-RH and analog on plasma gonadotropin levels and maturational response to 17  $\alpha$ -hidroxi-20  $\beta$ -dihidroprogesterone. Aquaculture, 32: p.105-114, 1983;

BRETON, B., JALABERT, B., BILLARD, R. & WEIL, C. Stimulation *in vitro* de la liberation d'hormone gonadotrope hypophysaire par un facteur hypothalamique chez la carpe (*Cyprinus carpio* L.). C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D 273, p.2591-2594, 1971 *apud* PETER, R. E. The brain and neurohormones in teleost reproduction. In: Hoar, W. S., Randall, D.J. & Donaldson, E.M., New York, Fish Phys., IX-A, 1983. p.97-135;

BRETON, B. & WEIL, C. Effects du LH/FSH-RH synthétique et d'extraits hypothalamiques de carpe sur la secretion d'hormone gonadotrope *in vivo* chez la carpe (*Cyprinus carpio* L.) C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D. 277, p.2061-2064, 1973 *apud* PETER, R.E. The brain and neurohormones in teleost reproduction In: Hoar, W. S., Randall, D. J. & Donaldson, E. M., New York, Fish Phys., IX-A, 1983. p.97-135;

BRITSKI, H. Sobre o gênero *Colossoma* (Pisces, Characidae). Ciência e Cultura, 29 (7): p. 810, 1977;

BROMAGE, N.R., ELLIOTT, J.A.K., SPRINGATE, J. R. C. & WHITEHEAD, C. The effects of constant photoperiods on the timing of spawning in the rainbow trout. Aquaculture,

43: p.213-223, 1983;

BRY, C. Temporal aspects of macroscopic changes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) oocytes before ovulation and of ova fertility during the post-ovulation period: effect of treatment with  $17\alpha$ -hydroxy- $20\beta$ -dihydroprogesterone. Aquaculture, 24: p.153-160, 1981  
*apud* LYLEY, N.R. & ROUGER, Y. Plasma levels of gonadotropin and  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in relation to spawning behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Biol., 37: p.699-711, 1990;

CAMPOS, H. ESTATÍSTICA EXPERIMENTAL NÃO-PARAMÉTRICA. 4. ed., Piracicaba, Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queiroz"-USP, 1983. 349p;

CANTELMO, O. A. & SOUZA, J. A. Uso das rações comerciais na criação do pacu (*Colossoma mitrei* Berg, 1895). B.Téc. CEPTA, Pirassununga 1 (1): p.37-44, 1988;

CAROLSFELD, J., RAMOS, S. M., ORMANEZI, R. *et al.* Analysis of protocols for application of an LHRH analog for induced final maturation and ovulation of female pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). Aquaculture, 74: p.49-55, 1988;

CAROLSFELD, J. Reproductive physiology & induced breeding of fish as related to culture of *Collossomas*. In: CULTIVO DE COLOSSOMA, Bogotá, Armando Hernandez R., 1989. p.37-64;

CAROLSFELD, J., HARVEY, B., SILVEIRA, W.F. *et al.* Criopreservação do sêmen do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. B. Tec. CEPTA, Pirassununga, 3: p.1-4, 1990;

- CASTAGONOLLI, N. & CYRINO, J. E. P. Desova induzida do curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881 (Pisces, Prochilodontidae). Ciência e Cultura. 32 (9): p.1245-1253, 1980;
- CASTAGNOLLI, N. & TONIOLO, G. M. Desova induzida de peixes reofílicos. Ciência e Cultura. 32 (33): p.337-343, 1980;
- CASTAGNOLLI, N. & ZUIM, S. M. F. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu (*Colossoma mitrei*) Berg, 1895. Bol. Tec. UNESP. Jaboticabal, (5): 30 p, 1985;
- CECCARELLI, P. S. Susceptibilidade à infestação de *Lernaea copepoda* Lernaeidae, Linnaeus em diferentes espécies de peixes cultivados no CEPTA e testes de infestação do pacu *Piaractus mesopotamicus* em laboratório. B. Téc. CEPTA, Pirassununga, 1 (2): p.31-35, 1988;
- CHABALIN, E. & FERRAZ DE LIMA, J. A. Análise econômica de um cultivo intensivo de pacu (*Colossoma mitrei*) no Centro Oeste do Brasil. B. Téc. CEPTA, Pirassununga, 1 (1): p.61-68, 1988;
- CHABALIN, E., FERRAZ DE LIMA, J.A. & ALVES, L.B.O. Análise comparativa entre o valor comercial do pacu (*Colossoma mitrei*) capturado e cultivado - mercado de peixes de Cuiabá. B. Téc. CEPTA, Pirassununga, 1 (1): p.49-60, 1988;
- CHAN, K.K.-S. Effect of synthetic luteinizing hormone-releasing (LH-RH) on ovarian development in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. Can. J. Zool., 55: p.155-160, 1977;
- CHANG, J.P., COOK, A.F. & PETER, R.E. Influence of catecholamines on gonadotropin secretion in goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol., 49: p.22-31, 1983;

- CHANG, J. P. & PETER, R. E. Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish, *Carassius auratus*. Neuroendocrinology 36: p.351-357, 1983;
- CHANG, J. P., PETER, R. E., NAHORNIK, C. S. & SOKOLOWSKA, M. Effects of catecholaminergic agonists and antagonists on serum gonadotropin concentrations and ovulation in goldfish: evidence for specificity of dopamine inhibition of gonadotropin secretion. Gen. Comp. Endocrinol. 55: p.351-360, 1984;
- CHANG, Y.-S., HUANG, F.-L., CHEN, C.-T. & LO, T.-B. Isolation and properties of the pituitary gonadotropin from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Int. J. Pep. Prot. Res., 31: p.150-156, 1988;
- CONROY, D. A. Reseña sobre las principales enfermedades infecto-contagiosas y parasitosis de peces del genero *Colossoma*. In: CULTIVO DE COLOSSOMA, Bogotá, Armando Hernandez R., 1989. p.93-113;
- CRAIK, J.C.A. & HARVEY, S.M. Egg quality in rainbow trout: The relation between egg viability, selected aspects of egg composition, and time of stripping. Aquaculture, 40: p.115-134, 1984 *apud* LYLEY, N.R. & ROUGER, Y. Plasma levels of gonadotropin and  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in relation to spawning behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Biol., 37: p.699-711, 1990;
- CRIM, L. W., EVANS, D.M., COY, D. H. & SCHALLY, A. V. Control of gonadotropic hormone release in trout: Influence of synthetic LH-RH and LH-RH analogues *in vivo* and *in vitro*. Life Sc., 28 (2): p.129-135, 1981;
- CRIM, L. W., EVANS, D. M. & VICKERY, B. H. Manipulation of the seasonal reproductive cycle of the landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*) by LHRH analogues

administered at various stages of gonadal development. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 40 (1): p.61-67, 1983a;

CRIM, L.W. & GLEBE, B.D. Advancement and synchrony of ovulation in Atlantic salmon with pelleted LHRH analog. Aquaculture, 43: p.47-56, 1984;

CRIM, L.W., GLEBE, B.D. & SCOTT, A.P. The influence of LHRH analog on oocyte development and spawning in female Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture, 56: p.139-149, 1986;

CRIM, L.W., SUTTERLIN, A.M., EVANS, D.M. & WEIL, C. Accelerated ovulation by pelleted LHRH analogue treatment of spring-spawning rainbow trout (*Salmo gairdneri*) held at low temperature. Aquaculture, 35: p.299-307, 1983b;

CULTIVO DE COLOSSOMA - REPRODUÇÃO, LARVICULTURA E GENÉTICA / CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES. Bogotá, Armando Hernández R., 1989. p.315-332;

CURY, M. & TSUKAMOTO, R.Y. A utilização de LH-RH comum (gonadorrelina) na reprodução induzida do pacu *Collossoma mitrei* Berg, em condições de campo (Pisces, Serrassalmidae). In: Simp. Latinoamer., VI, e Simp. Bras. Aquicultura, V, 1988, Florianópolis. Anais... 1988. p.505 - 512;

DONALDSON, E. M. & HUNTER, G. A. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. In: Hoar, W. S., Randall, D. J. & Donaldson, E. M., New York, Fish Physiology, IX-B, 1983. p.351-403;

- DONALDSON, E.M., HUNTER, G.A. & DYE, H.M. Induced ovulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). II. Preliminary study of the use of LH-RH and two high potency LH-RH analogues. Aquaculture, 26: p.129-141, 1981/1982;
- EPLER, P., SOKOLOWSKA, M., POPEK, W. & BIENIARZ, K. Joint action of carp (*Cyprinus carpio* L.) pituitary homogenate and human chorionic gonadotropin (HCG) in carp oocyte maturation and ovulation: *in vitro* and *in vivo* studies. Aquaculture, 51: p.133-142, 1986;
- EPLER, P. & BIENIARZ, K. Gonad maturation and hormonal stimulation of spawning in wels (*Silurus glanis*, L.). Pol. Arch. Hydrobiol., 36 (3): p.417-429, 1989;
- ESCAFRE, A. M. & BILLARD, R. Changes in the fertilizability of rainbow trout eggs left in the abdominal cavity during the post ovulatory period. Bull. Francais de Piscic., 272: p.56-70, 1979 *apud* LYLEY, N. R. & ROUGER, Y. Plasma levels of gonadotropin and  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in relation to spawning behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Biol., 37: p.699-711, 1990;
- FELICI, M. DE, DOLCI, S. & SIRACUSA, G. An increase of intracellular free  $Ca^{2+}$  is essential for spontaneous meiotic resumption by mouse oocytes. J. Exper. Zool., 260: p.401-405, 1991;
- FERRAZ DE LIMA, J.A. A pesca no pantanal de Mato Grosso (rio Cuiabá: Biologia e ecologia pesqueira). In: Cong. Bras. Eng. Pesca, II, 1981, Recife. Anais... 1981. p.503-516;
- FERRAZ DE LIMA, J. A. Atuações do CEPTA para a expansão do cultivo dos *Colossoma* e *Piaractus*. In: CULTIVO DE COLOSSOMA, Bogotá, Armando Hernandez R., 1989.

p.277-309;

FERRAZ DE LIMA, J. A., BARBIERI, G. & VERANI, J. R. Período de reprodução, tamanho e idade de primeira maturação gonadal do pacu, *Colossoma mitrei*, em ambiente natural (rio Cuiabá - Pantanal de Mato Grosso). In: Simp. Brasil. Aqüicul., III, 1984, São Carlos. Anais... 1984. p.477-497;

FERRAZ DE LIMA, J.A., CAROLSFELD, J., RAMOS, S.M. *et al.* Uso de "OVAPRIM" [Combinação de um antagonista de dopamina (Domperidona) mais um análogo do hormônio liberador de gonadotropina de salmão (sGnRH-A)] na indução da desova do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criado em cativeiro. B.Téc. CEPTA, Pirassununga, 1 (2): p.1-9, 1988;

FONTAINE, M. Hormones and the control of reproduction in aquaculture. J. Fish. Res. Board Can. 33: p.922-939, 1976;

FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia da curimatã pacu, *Prochilodus argenteus* Spix in Spix & Agassiz. Rev. Brasil. Biol., 13 (1): 87-102, 1953;

FONTENELE, O. Injecting pituitary (hypophyseal) hormones into fish to induce spawning. Col. Trab. Técnicos, DNOCS, Fortaleza, p.277-286, 1982;

GABILAN, N. H., ROCHA, M. J. A., THIESEN, A. *et al.* Purificação de gonadotropina hipofisária de tainha (*Mugil sp.*). In: Simp. Brasil. Aqüic., IV, 1986, Cuiabá. Resumo... 1986. p.58;

GARCIA, L. M. B. Development of an ovarian biopsy technique in the sea bass, *Lates Calcarifer* (Bloch). Aquaculture, 77: p.97-102, 1989;

- GARCIA, L.M.B. Advancement of sexual maturation and spawning of sea bass, *Lates Calcarifer* (Bloch), using pelleted luteinizing hormone-releasing hormone analogue and  $17\alpha$ -methyltestosterone. Aquaculture, 86: p.333-345, 1990;
- GERKING, S.D. Fish reproduction and stress. In: ENVIRONMENTAL PHYSIOLOGY OF FISHES., Montreal, M. A. Ali., 1979. p.569-587;
- GÉRY, J. Notes de Characologie néotropical, 1. Progres dans la systématique des genres *Colossoma* et *Piaractus*. Revue Fr. Aquariol., 12 (4): 97-102, 1986;
- GILMAN, A. G., GOODMAN, L. S. & GILMAN, A. "Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics," 6. ed., New York, Macmillan Co., 1980 *apud*
- CHANG, J.P., COOK, A.F. & PETER, R.E. Influence of catecholamines on gonadotropin secretion in goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol., 49, p.22-31, 1983;
- GLUBOKOV, A.I, MIKODINA, E.V., VACHTA, R. *et al.* Stimulation of maturation in rainbow trout females by metoclopramide, a dopamine receptor antagonist, and by LHRH analogue. Aquaculture, 100: p.324, 1992;
- GODINHO, H. M., FENERICH, N. A., NARAHARA, M. Y. & BARKER, J. M. B. Sobre a reprodução induzida do pacu, *Colossoma mitrei* (Berg 1885). Ciência e Cultura, 29 (7): p.796-797, 1977;
- GODINHO, H. P. & GODINHO, A. L. Induced spawning of the pacu, *Colossoma mitrei* (Berg, 1895), by hypophysation with crude carp pituitary extract. Aquaculture, 55: p.69-73, 1986;

- GODINHO, H.P. & GODINHO, A.L. Parâmetros reprodutivos de pacus (*Colossoma mitrei*) submetidos à hipofiseção com extrato de hipófise de carpa. In: Encontro Anual de Aquicultura de Minas Gerais, 4, 1985, Viçosa. Col. Res. Encontros da Associação Mineira de Aquicultura, 1982-1987, Brasília, CODEVASE, 1988. p.78-79;
- GOETZ, F. W. & BERGMAN, H. L. The effects of steroids on final maturation and ovulation of oocytes from brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and yellow perch (*Perca flavescens*). Biol. Repro., 18: p.293-298, 1978;
- GOMES, F. P. CURSO DE ESTATÍSTICA EXPERIMENTAL. 7. ed., Piracicaba, Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz - USP, 1977. 430p;
- GURAYA, S. S. Follicular atresia. Indian Natl. Sci. Acad. Proceedings... 39, 1973. p.311-332;
- GURAYA, S.S. THE CELL AND MOLECULAR BIOLOGY OF FISH OOGENESIS. New York, H. W. SAUER, 1986. 223p., il.;
- HALDER, S., SEN, S., BHATTACHARYA, S. *et al.* Induced spawning of Indian major carps and maturation of a perch and a catfish by murrel gonadotropin releasing hormone, pimozide and calcium. Aquaculture, 97: p.373-382, 1991;
- HARVEY, B.J. & HOAR, W.S. Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces. Ottawa, CIID, 1980. 48p. il.;
- IHERING, R. VON & AZEVEDO P. A desova e hipofiseção dos peixes. Evolução de dois nematognathas. Arquivos Inst. Biol. São Paulo, 7: p.107-118, 1936;

- IHERING, R. VON & AZEVEDO P. A curimatã dos açudes nordestinos (*Prochilodus argenteus*). Col. Trab. Técnicos. DNOCS, 2: p.227-306, 1981 (Arch. Inst. Biol., São Paulo - vol. 5, 1934);
- JALABERT, B. In vitro oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Northern pike (*Esox lucius*) and goldfish (*Carassius auratus*). J. Fish. Res. Board Can., 33: p.974-988, 1976;
- JALABERT, B., BRETON, B., BRZUSKA, E. *et al.* A new tool for induced spawning: the use of 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogesterone to spawn carp at low temperature. Aquaculture, 10: p.353-364, 1977;
- JALABERT, B. & FOSTIER, A. The follicular sensitivity *in vitro* to maturation - inducing hormones in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: role of oestradiol-17 $\beta$ . Aquaculture, 43: p.1-11, 1984;
- KOSTRZEWA, R. M. & JACOBOWITZ, D. M. Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. Pharmacol. Rev. 2, p.199-288, 1974 *apud* CHANG, J.P., COOK, A.F. & PETER, R.E. Influence of catecholamines on gonadotropin secretion in goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol., 49, p.22-31, 1983;
- KUO, C.-M., NASH, C.E. & SHEHADEH, Z.H. A procedural guide to induce spawning in grey mullet (*Mugil cephalus* L.). Aquaculture 3: p.1-14, 1974;
- KUO, C.-M. & NASH, C.E. Recent progress on the control of ovarian development and induced spawning of the grey mullet (*Mugil cephalus* L.). Aquaculture, 5: p.19-29, 1975;

- LEE, C. -S., TAMARU, C. S. & KELLEY, C. D. The cost and effectiveness of CPH, HCG and LHRH-a on the induced spawning of grey mullet, *Mugil cephalus*. Aquaculture, **73**: p.341-347, 1988;
- LIMA, R.V.A. Ovário de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), criado em cativeiro - estudo do ciclo maturacional e cultura de oócitos "in vitro". São Paulo: USP, 1990: 189p. Tese (Mestrado em Fisiologia) - Instituto de Biociências, USP, 1990;
- LIMA, R. V. A., BERNARDINO, G., VAL-SELLA, M. V. *et al.* Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantidos em cativeiro. B. Tec. CEPTA, Pirassununga, **4** (1): p.1-46, 1991;
- LIN, H.-R., KRAAK, G. VAN DER, ZHOU, X.-J. *et al.* Effects of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9 NEt] - luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH-A) and [D-Ala6, Pro9 NEt] - luteinizing hormone- releasing hormone (LHRH-a), in combination with pimozide or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. Gen. Comp. Endocrinol., **69**: p.31-40, 1988;
- LIN, H.-R., PENG, C., KRAAK, G. VAN DER *et al.* Effects of [D-Ala6, Pro9 - NEt] - LHRH and catecholaminergic drugs on gonadotropin secretion and ovulation in the Chinese loach (*Paramisgurnus dabryanus*). Gen. Comp. Endocrinol., **64**: p.389-395, 1986;
- LIN, H-R, ZHOU, X-J, VAN DER KRAAK, G & PETER, R.E. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonists and dopamine antagonists on gonadotropin secretion and ovulation in Chinese loach, *Paramisgurnus dabryanus*. Aquaculture, **95**: p.139-147, 1991;

- LYLEY, N.R. & ROUGER, Y. Plasma levels of gonadotropin and  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in relation to spawning behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Biol., 37: p.699-711, 1990;
- MACKENZIE, D. S., GOULD, D. R., PETER, R. E. *et al.* Response of superfused goldfish pituitary fragments to mammalian and salmon gonadotropin-release hormones. Life Sc., 35 (20): p.2019-2026, 1984;
- MATSUYAMA, M., ADACHI, S., NAGAHAMA, Y. & MATSUURA, S. Diurnal rhythm of oocyte development and plasma steroid hormone levels in the female red sea bream, *Pagrus major*, during the spawning season. Aquaculture, 73: p.357-372, 1988;
- MENTON, D.J. Research considerations into the nutrition of *Collossoma* and *Piaractus* in relation to culture conditions. In: CULTIVO DE COLOSSOMA, Bogotá, Armando Hernandez R., 1989. p.75-84;
- NANDEESHA, M.C., KESHAVANATH, P., VARGHESE, T.J. *et al.* Alternate inducing agents for carp breeding: Progress in research. IN: CARP SEED PRODUCTION TECHNOLOGY., Asian Fish. Soc., 1990. p.12-16;
- NATH, P. & SUNDARARAJ, B.I. Induction of vitellogenesis in the hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch): effects of piscine and mammalian hormones. Gen.Comp.Endocrinol. 43: p.191-200, 1981;
- NOMURA, M., SAKAI, K. & TAKASHIMA, F. The over-ripening phenomenon of rainbow trout - I. Temporal morphological changes of eggs retained in the body cavity after ovulation. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 40, p.977-984, 1974 *apud* LYLEY, N.R. & ROUGER, Y. Plasma levels of gonadotropin and  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in relation to

spawning behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Biol., 37: p.699-711, 1990;

OMELJANIUK, R.J., HABIBI, H.R. & PETER, R.E. Alterations in pituitary GnRH and dopamine receptors associated with the seasonal variation and regulation of gonadotropin release in the goldfish (*Carassius auratus*). Gen. Comp. Endocrinol. 74: p.392-399, 1989;

OMELJANIUK, R.J., SHIH, S.H. & PETER, R.E. *in vivo* evaluation of pituitary dopamine receptor mediated inhibition of gonadotropin secretion in the goldfish, *Carassius auratus*. J. Endocrinol. (In press) *apud* LIN, H.-R., KRAAK, G. VAN DER, ZHOU, X.-J. *et al.* Effects of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9 NEt]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-a), in combination with pimozide or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. Gen. Comp. Endocrinol., 69, p.31-40, 1988;

PETER, R.E. Serum gonadotropin levels in mature male goldfish in response to luteinizing hormone - releasing hormone (LH-RH) and des-Gly10-[D-Ala6] - LH-RH ETHYLAMIDE. Can. J. Zool. 58: p.1100-1104, 1980;

PETER, R.E. Neuroendocrine control of reproduction in teleosts. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 39: p.48-55, 1982;

PETER, R.E. The brain and neurohormones in teleost reproduction. In: Hoar, W. S., Randall, D. J. & Donaldson, E. M., New York, Fish Phys., IX-A 1983. p.97-135;

PETER, R.E., CHANG, J.P., NAHORNIK, C.S. *et al.* Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. Recent Prog. Horm. Res.,

42: p.513-548, 1986;

PETER, R.E., NAHORNIK, C.S., SOKOLOWSKA, M. *et al.* Structure- activity relationships of mammalian, chicken, and salmon gonadotropin-releasing hormones *in vivo* in goldfish. Gen. Comp. Endocrinol. 58, p.231-242, 1985 *apud* LIN, H.-R., KRAAK, G. VAN DER, ZHOU, X.-J. *et al.* Effects of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9 NET] - luteinizing hormone - releasing hormone (LHRH-a), in combination with pimozide or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. Gen. Comp. Endocrinol., 69: p.31-40, 1988;

PETER, R.E., SOKOLOWSKA, M., NAHORNIK, C.S. *et al.* Comparison of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9 NET]-luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH-A) and [D-Ala6, Pro9 NET]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozide, in stimulating gonadotropin release and ovulation in the goldfish, *Carassius auratus*. Canad. J. Zool. 65, p-987-991, 1987 *apud* LIN, H. -R., KRAAK, G. VAN DER, ZHOU, X. -J. *et al.* Effects of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9 NET]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-a), in combination with pimozide or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. Gen. Comp. Endocrinol., 69: p.31-40, 1988;

RAMOS, J. Luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LH-RHa) induces precocious ovulation in common sole (*Solea solea* L.). Aquaculture, 54: p.185-190, 1986;

RESINK, J. W., BERG, T. W. M. VAN DEN, HURK, R. VAN DEN *et al.* Induction of gonadotropin release and ovulation by pheromones in the African catfish, *Clarias gariepinus*. Aquaculture. 83: p.167-177, 1989;

- RIBEIRO, L. P., BERNARDINO, G., MENDONÇA, J. O. *et al.* Ovulação induzida do pacu (*Colossoma mitrei*), com hormônio liberador de gonadotropina. In: Simp. Brasil. Aquic., IV, 1986, Cuiabá. Resumos... 1986. p.83;
- ROMAGOSA, E. Mudanças morfológicas (microscopia de luz e eletrônica) das gônadas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) durante o ciclo reprodutivo, em condições de confinamento. Rio Claro: UNESP, 1991, 177p., Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 1991;
- ROMAGOSA, E.; PAIVA, P. & GODINHO, H.M. Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg, 1895), induced to spawn. Aquaculture, 86: p.105-110, 1990;
- ROMAGOSA E., PAIVA, P., GODINHO, H.M. *et al.* Indução da reprodução de pacu, *Colossoma mitrei* Berg, 1895, em primeira maturação gonadal, mantidos sob condições de cultivo intensivo. In: Cong. Bras. Eng. de Pesca, 4, 1985, Curitiba. Resumos... 1985. p.55;
- ROMAGOSA, E., PAIVA, P., GODINHO, H.M. & STORFER, E.B. Desenvolvimento dos ovócitos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg, 1895) em condições de cultivo intensivo. Ciência e Cultura 40 (1): p.60-64, 1988;
- ROSA, A.A.M., CASTAGNOLLI, N. & MAGALHÃES, M.S.O. Indução da desova do pacu *Colossoma mitrei* com um análogo superpotente do LH-RH (D Try6-LH-RH). In: Simp. Bras. Aquic., IV, 1986, Cuiabá. Resumos... 1986. p.85;
- SAKAI, K., NOMURA, M., TAKASHIMA, F. & OTO, H. The over-ripening phenomenon of rainbow trout - II. Changes in the percentage of eyed eggs, hatching rate and incidence

of abnormal alevins during the process of over-ripening. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 41: p.855-860, 1975 *apud* LYLEY, N.R. & ROUGER, Y. Plasma levels of gonadotropin and  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in relation to spawning behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Biol., 37: p.699-711, 1990;

SHEHADEH, Z. H., KUO, C. M. & MILISEN, K.K. Validation of an *in vivo* method for monitoring ovarian development in the grey mullet (*Mugil cephalus*). J. Fish Biol., 5: p.489-496, 1973;

SHERWOOD, N. M., CRIM, L. W., CAROLSFELD, J. & WALTERS, S. M. Sustained hormone release. I. Characteristics of *in vitro* release of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH-A) from pellets. Aquaculture, 74: p.75-86, 1988;

SHERWOOD, N.M., HARVEY, B., BROWNSTEIN, M.J. & EIDEN, L.E. Gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) in striped mullet (*Mugil cephalus*), milkfish (*Chanos chanos*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*): comparison with salmon Gn-RH. Gen.Comp.Endocrinol., 55: p.174-181, 1984;

SILVA, A.B., CARNEIRO SOBRINHO, A. & MELO, F.R. Desova induzida de tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, com o uso de hipófise de curimatã comum, *Prochilodus cearensis* Steindachner. In: Col. Trab. Téc. DNOCS, 2, Fortaleza, p.519-531, 1981;

SILVA FILHO, J.A. Reprodução induzida e larvicultura do pacu-guaçu, *Colossoma mitrei* Berg, 1895, na Estação de Aquicultura de Salto Grande, SP (CESP). In: Simp. Brasil. Aquic., IV, 1986, Cuiabá. Resumos... 1986. p.82;

- SILVA, M. C. N. & PINHEIRO, J. L. P. Cultivo de *Collossoma* na CODEVASF (Situação Atual). In: CULTIVO DE COLOSSOMA, Bogotá, Armando Hernandez R., 1989. p.259-275;
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. BIOMETRIA - PRINCIPIOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS EN LA INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA. Madrid, H. Blune, 1979. 831p;
- SOKOLOWSKA, M., PETER, R.E., NAHORNIK, C.S. *et al.* Induction of ovulation in goldfish *Carassius auratus*, by pimozide and analogues of LHRH. Aquaculture, 36: p.71-83, 1984;
- SPRINGATE, J.R.C., BROMAGE, N.R., ELLIOTT, J.A.K. & HUDSON, D.L. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eying, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) Aquaculture, 43: p.313-322, 1984 *apud* LYLEY, N.R. & ROUGER, Y. Plasma levels of gonadotropin and  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-on in relation to spawning behavior of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Biol., 37: p.699-711, 1990;
- STEFAN, E.R. O Pantanal Mato-Grossense. Separata da Rev. Bras. Geografia, Rio de Janeiro, n.3, 1964 *apud* FERRAZ DE LIMA, J.A. A pesca no pantanal de Mato Grosso (rio Cuiabá: Biologia e ecologia pesqueira). Cong. Bras. Eng. Pesca, II, 1981, Recife. Anais... 1981. p.503-516;
- STELL, R.G.D. & TORRIE, J. H. PRINCIPLES AND PROCEDURES OF STATISTICS. 2. ed., New York, McGraw-Hill, 1980. 633p;

- TAMARU, C.S., LEE, C.S., KELLEY, C.D. *et al.* Characterizing the stage of maturity most receptive to an acute LHRH-analogue therapy for inducing milkfish (*Chanos chanos*) to spawn. Aquaculture, 74: p.147-163, 1988;
- TEODORO, A.J. & FERRAZ DE LIMA, J.A. Requisitos para a obtenção de reprodução espontânea do pacu, *Colossoma mitrei*, em cativeiro. In: Simp.Brasil.Aquic., IV, 1986, Cuiabá. Resumos... 1986. p.84;
- TORLONI, C. E. C., REIS, M. A.G., SICILIANO, S.F. & VERANI, J. R. Análise quantitativa e econômica numa criação de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) em propriedade rural do vale do Ribeira, Estado de São Paulo. São Paulo, CESP, 1991. 15p;
- TRUDEAU, V.L., LIN, H.R. & PETER, R.E. Testosterone potentiates the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in the common carp (*Cyprinus carpio*) and Chinese loach (*Paramisgurnus dabryanus*). Can. J. Zool. 69: p.2480-2484, 1991;
- UPADHYAYA, N. & HAIDER, S. Germinal vesicle breakdown in oocytes of catfish, *Mystus vittatus* (Bloch) relative *in vitro* effectiveness of estradiol-17 $\beta$ , androgens, corticosteroids, progesterone, and other pregnene derivatives. Gen. Comp. Endocrinol. 63 (1): p.70-76, 1986;
- VAN ASSELT, L. A. C., GOOS, H. J. Th., SMIT-VAN DIJK, W. *et al.* Evidence for the involvement of D2 receptors in the dopaminergic inhibition of gonadotropin release in the African catfish, *Clarias gariepinus*. Aquaculture, 72: p.369-378, 1988;

- VAN DER KRAAK, G., DONALDSON, E. M. & CHANG, J. P. Dopamine involvement in the regulation of gonadotropin secretion in coho salmon. Can. J. Zool., 64: p.1245-1248, 1986;
- VAN WEERD, J.H., BONGERS, A.B.J., SCHULZ, R. *et al.* Plasma androgen levels in castrated adult male African catfish, *Clarias gariepinus*, in relation to pheromonal stimulation of ovarian growth in pubertal conspecifics. Aquaculture, 97: p.97-107, 1991;
- VAN WEERD, J. H., SUKKEL, M., BIN AWANG KECHIK, I. *et al.* Pheromonal stimulation of ovarian recrudescence in hatchery-raised adult African catfish, *Clarias gariepinus*. Aquaculture. 90: p.369-387, 1990;
- VAZZOLER, A.E.A.M. MANUAL DE MÉTODOS PARA ESTUDOS BIOLÓGICOS DE POPULAÇÕES DE PEIXES: REPRODUÇÃO E CRESCIMENTO. Brasília, CNPq-Prog. Nac. Zool., 1981. 108p;
- YAMAZAKI, F. & DONALDSON, E.M. The effects of partially purified salmon pituitary gonadotropin on spermatogenesis, vitellogenesis and ovulation in hypophysectomized goldfish (*Carassius auratus*) Gen. Comp. Endocrinol., 11: p.292-299, 1968;
- WALLACE, R.A. & SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Amer. Zool., 21: p.325-343, 1981;
- WEIL, C., BILLARD, R., BRETON, B. & JALABERT, B. Pituitary response to LH-RH at different stages of gametogenesis in the rainbow trout (*Salmo fairdneri*). Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 18: p.863-869, 1978 *apud* CRIM, L. W., EVANS, D.M. &

- VICKERY, B.H. Manipulation of the seasonal reproductive cycle of the landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*) by LHRH analogues administered at various stages of gonadal development Can. J. Fish. Aquat. Sci., 40 (1): p.61-67, 1983a;
- WEIL, C., BRETON, B. & REINAUD, P. Etude de la réponse hypophysaire à l'administration de GnRH exogène au cours du cycle reproducteur annuel chez la carpe *Cyprinus carpio* L. C.R. Acad. Sci. 280D: p.2469-2472, 1975 *apud* CRIM, L.W., EVANS, D.M. & VICKERY B.H. Manipulation of the seasonal reproductive cycle of the landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*) by LHRH analogues administered at various stages of gonadal development. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 40 (1): p.61-67, 1983a;
- WOODHEAD, P.M.J. Seasonal changes in the calcium content of the blood of arctic cod. J. Mar. Biol., Ass. U. K., 48, p.81-91, 1968 *apud* KUO, C.-M., NASH, C.E. & SHEHADEH, Z.H. A procedural guide to induce spawning in grey mullet (*Mugil cephalus* L.). Aquaculture, 3: p.1-14, 1974;
- WOYNAROVICH, E. & HORVÁTH, L. A PROPAGAÇÃO ARTIFICIAL DE PEIXES DE ÁGUAS TROPICAIS - MANUAL DE EXTENSÃO. Trad. CHAMA, V. L. M., Brasília, FAO/CODEVASF/CNPq, 1983. 225p. Original inglês;
- WOYNAROVICH, E. TAMBAQUI E PIRAPITINGA - PROPAGAÇÃO ARTIFICIAL E CRIAÇÃO DE ALEVINOS. Brasília, PRONI-CODEVASF, 2, 1986. 68p;
- ZAMBRANO, D. The ultrastructure catecholamine and prolactin contents of the rostral pars distalis of the fish *Mugil platanus* after reserpine or 6-hydroxydopamine administration. Cell. Tissue Res. 162, p.551-563, 1975 *apud* CHANG, J.P., COOK, A.F. & PETER, R.E. Influence of catecholamines on gonadotropin secretion in goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol., 49, p.22-31, 1983;

ZANIBONI FILHO, E. & BARBOSA, N.D.C. Importância de uma aplicação prévia de hormônio na indução a desova de peixes reofílicos. In: Enc. Anual de Aquicultura de Minas Gerais, 1990/1991, Belo Horizonte, Associação Mineira de Aquicultura, 1991. p.33;

ZANUY, S. & CARRILLO, M. La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura. In: REPRODUCCIÓN EN ACUICULTURA. CAICYT-J. Espinosa Monteros e U. Labarta., 1987. 131p;