

UNIVERSIDADE FEDERAL MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

Reprodução induzida de machos de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) com
hormônio Kisspeptina

ANDREIA REGINA KONZEN FREITAS

ORIENTADOR: PROF. DR. JAYME

APARECIDO POVH

CAMPO GRANDE, MS

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

***REPRODUÇÃO INDUZIDA DE LAMBARI (*Astyanax lacustris*) COM HORMÔNIO
KISSPEPTINA***

ANDREIA REGINA KONZEN FREITAS

ORIENTADOR: PROF. DR. JAYME

APARECIDO POVH

Dissertação apresentada á
Universidade Federal do Mato
Grosso do Sul, como requisito a
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal. Área de
concentração: Produção animal

CAMPO GRANDE, MS

2022



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Certificado de aprovação

ANDREIA REGINA KONZEN FREITAS

Reprodução induzida de machos de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) com hormônio Kisspeptina

Induced reproduction of male yellow-tailed lambari (*Astyanax lacustris*) with Kisspeptin hormone

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

Aprovado em: 26-08-2022

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Jayme Aparecido Povh
(UFMS) – (Presidente)

Dr. Diogenes Henrique de Siqueira Silva
(UNIFESSPA)

Dr. Ruy Alberto Caetano Correa Filho
(UFMS)



Documento assinado eletronicamente por **Jayme Aparecido Povh, Professor do Magisterio Superior**, em 23/09/2022, às 17:11, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ruy Alberto Caetano Correa Filho, Professor do Magisterio Superior**, em 29/09/2022, às 14:51, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diogenes Henrique de Siqueira Silva, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 08:40, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3570164** e o código CRC **A5386AAC**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.001236/2021-33

SEI nº 3570164

Dedicatória

Aos meus pais e irmã, que sempre foram meu maior incentivo, espelho e parceria de vida.

Aos meus amigos velhos, amigos novos, e todos os colegas que me socorreram e apoiaram em todos os momentos.

Aos professores (Professor Dr. Jayme Povh e Dr. Professor Ruy Corrêa Filho) que facilitaram e me ajudaram trilhar toda essa jornada, e que sempre escutaram com grande apoio os meus pedidos de socorro e de orientação.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Piscicultura Água Azul.

Lembre-se da minha ordem: Seja forte e corajoso, porque eu, o Senhor, o seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for!

Josué 1:9

Resumo

KONZEN-FREITAS, A.R., Reprodução induzida de lambari (*Astyanax lacustris*) com hormônio kisspeptina. 2022. 42p. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2022.

O extrato de hipófise de carpa é o principal indutor reprodutivo utilizado em peixes, mas tem sido questionado nos últimos anos, principalmente, considerando a falta de padronização hormonal. Neste sentido, muitos indutores reprodutivos vêm sendo avaliados em peixes. Entre estes, cabe destacar a kisspeptina, a qual é produzida a partir do hipotálamo e causa uma cascata de comunicação célula-célula, levando à produção do hormônio luteinizante e hormônio folículo-estimulante na hipófise. O objetivo do estudo foi avaliar o desempenho reprodutivo do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) induzidos com o indutor kisspeptina. Foram utilizados 49 machos em idade reprodutiva. Foram avaliados três níveis de kisspeptina: 0,020, 0,050 e 0,080 mg/kg de peso vivo em dose única. Adicionalmente, foi avaliado um grupo de peixes induzidos com o protocolo padrão com extrato de hipófise de carpa – EHC (2,5 mg/kg em dose única) e um grupo em que foi aplicado soro fisiológico. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento. O sêmen foi coletado após 270 horas-graus para o grupo de peixes que recebeu kisspeptina e 160 horas-grau para o grupo induzido com EHC e soro fisiológico. A concentração de espermatozoides não diferiu entre os diferentes tratamentos (entre 0,8 e 1,03 x 10⁹ espermatozoides/mL). A mediana dos valores da motilidade total foram maiores (P<0,05) nos peixes induzidos com EHC (28,8%) em relação aos peixes induzidos com os diferentes níveis de kisspeptina (entre 13 e 14,7%) e com soro fisiológico (13,2%). O mesmo comportamento foi observado para as variáveis velocidade curvilinear, velocidade média de trajetória, amplitude do movimento lateral da cabeça e frequência de batimento flagelar, em que foram obtidos maiores (p<0,05) valores para os peixes induzidos com EHC. Por outro lado, para as variáveis coeficiente de linearidade, coeficiente de retilinearidade e oscilação média da trajetória espacial do espermatozoide, os valores foram maiores (P<0,05) nos peixes induzidos com EHC em relação aos induzidos com 0,02 e 0,08 de kisspeptina e a solução salina, mas não diferiu do nível de 0,05 mg/kg. Conclui-se que as concentrações de kisspetina avaliadas não foram efetivas para melhorar as variáveis reprodutivas de machos de lambari-do-rabo-amarelo. Palavras-chave: **Características reprodutivas, indução hormonal, Kisspetina, peixes reofílicos.**

Abstract

KONZEN-FREITAS, A.R., Induced reproduction of lambari (*Astyanax lacustris*) with kisspeptin hormone. 2022. 42p. Dissertation – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2022.

Carp pituitary extract is the main reproductive inducer used in fish, but it has been questioned in recent years, mainly considering the lack of hormonal standardization. In this sense, many reproductive inducers have been evaluated in fish. Among these, kisspeptin should be highlighted, which is produced from the hypothalamus and causes a cell-cell communication cascade, leading to the production of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the pituitary. The aim of the study was to evaluate the reproductive performance of the yellow-tailed lambari (*Astyanax lacustris*) induced with the inducer kisspeptin. 49 males of reproductive age were used. Three levels of kisspeptin were evaluated: 0.020, 0.050 and 0.080 mg/kg of body weight in a single dose. Additionally, a group of fish induced with the standard protocol with carp pituitary extract - EHC (2.5 mg/kg in a single dose) and a group in which saline solution was applied were evaluated. 10 replicates per treatment were used. Semen was collected after 270 degree-hours for the group of fish that received kisspeptin and 160 degree-hours for the group induced with EHC and saline. The sperm concentration did not differ between the different treatments (between 0.8 and 1.03 x 10⁹ sperm/mL). The median of total motility values were higher (P<0.05) in fish induced with EHC (28.8%) in relation to fish induced with different levels of kisspeptin (between 13 and 14.7%) and with serum physiological (13.2%). The same behavior was observed for the variables curvilinear velocity, average velocity of trajectory, amplitude of lateral movement of the head and frequency of flagellar beat, in which higher values (p<0.05) were obtained for fish induced with EHC. On the other hand, for the variables coefficient of linearity, coefficient of straightness and mean oscillation of the spatial trajectory of the sperm, the values were higher (P<0.05) in fish induced with EHC in relation to those induced with 0.02 and 0, 08 of kisspeptin and saline, but did not differ from the level of 0.05 mg/kg. It is concluded that the evaluated kisspeptin concentrations were not effective to improve the reproductive variables of males of yellow-tailed lambari.

Keywords: Reproductive characteristics, hormonal induction, Kisspetina, rheophilic fish.

SUMÁRIO

1	Introdução	11
2	Revisão de literatura	12
2.1	Reprodução em peixes migradores.....	13
2.1.1	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas.....	14
2.2.2	Principais indutores utilizados na reprodução induzida de peixes	15
2.1.3	Características de análise espermática – casa	18
3.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
1.0	INTRODUÇÃO	26
2	MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1	Local e peixes	27
2.2	Delineamento experimental.....	27
2.3	Coletas amostrais.....	29
2.4	Variáveis de qualidade seminal	29
2.5	Análises estatísticas	31
3	RESULTADOS.....	32
4	Discussão	35
5	CONCLUSÃO	37
6	- Referências	38

1 INTRODUÇÃO

A produção de pescado proveniente da pesca e aquicultura tem papel fundamental hoje na contribuição para segurança e alimentar mundial. A produção global de animais aquáticos foi de 178 milhões de toneladas em 2020, sendo 90 milhões de toneladas provenientes da pesca (51%), enquanto a aquicultura produziu 88 milhões de toneladas (49%), desse volume total 63% foram de águas marinhas e 37 % de água doce. Além dos animais aquáticos devemos destacar também a produção de algas originadas da aquicultura com um montante de 36 milhões de toneladas (peso úmido), conforme observado nos dados da FAO (2022).

A produção de pescado no Brasil atingiu 551.873.845 kg de peixe, desse volume os peixes mais produzidos em ordem decrescente foram: tilápia (62,26%), tambaqui (18,22%), tambatinga e tambacu (7,86%), carpas (3,08%), pintado, cachara, cachapira e pintachara e surubim (2,11%), pacu e patinga (2,01%), outros peixes (0,70%), matrinxã (0,65%), Jatuarana, piabanha e piracajunba (0,64%), curimatã e curimbatá (0,58%), piau, piapara, piaçu e piava (0,53%), truta (0,38%), pirarucu (0,34%), pirapitinga (0,33%), traíra e trairão (0,15%), lambari (0,11%), tucunaré (0,02%) e dourado (0,01%) de acordo com a figura 01 com consulta ao (IBGE, 2020).

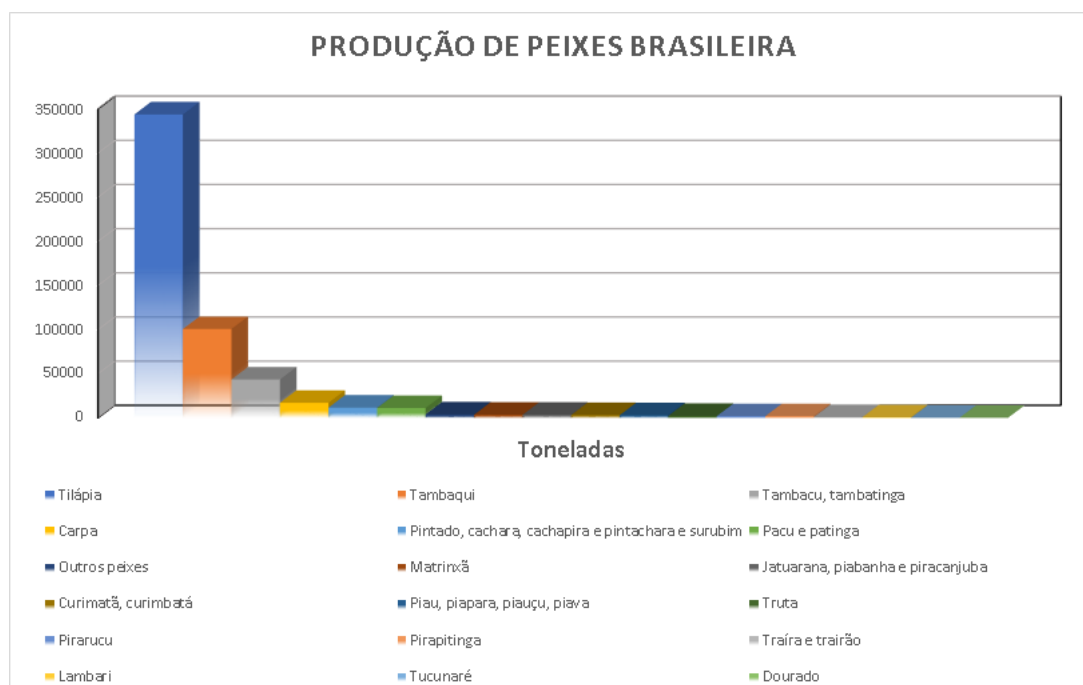


Figura 1 - Produção de peixes brasileira no ano de 2020 - IBGE.

Esse volume de produção tem influência direta no aumento de oferta de pescado aos consumidores e por consequência no consumo. O consumo de animais de origem aquática per capita teve acréscimo de consumo com taxa média de 1,4% ao ano de 1961

a 2019, o que configura um crescimento de consumo de 9,0 kg em 1961 para 20,5 kg em 2019. Entre as espécies nativas estão diversas espécies de lambari, de acordo com IBGE a produção de lambari foi registrada um montante de 631.173 kg em 2020. O *Astyanax lacustris* é uma espécie com possibilidade de ampliação, além de ser um peixe muito procurado para pesca esportiva, também tem muita aceitação para o mercado gastronômico como petisco (Hayashi et al., 2004). Considerando o valor econômico e biológico, é importante o desenvolvimento de tecnologias de aporte a reprodução de peixes reofílicos, tanto sob o ponto de vista de produção comercial quanto de preservação da espécie para o ecossistema (Carneiro-Leite et al., 2020).

2 Revisão de literatura

Astyanax lacustris

O lambari é uma espécie nativa brasileira, que pertence à família Characidae (Caracídeos), subfamília Tetragonopterinae. Dentre as ordens de peixes encontradas na região Neotropical podem incluir a dos Characiformes, constituída por 24 famílias (Eschmeyer, 2017). A que concentra maior número de espécies é a Characidae, com aproximadamente 1161 espécies (Eschmeyer, 2017), logo podemos destacar o gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854). Espécies desse gênero, possuem características de exploração de micro habitats, formando pequenas populações restritas, formando assim variação entre as populações (Garutti e Britski, 2000). Possuem interesse econômico para consumo humano, mas principalmente para o mercado de iscas-vivas e como peixe ornamental (Sussel, 2015; Sato et al., 2006) ou ainda, pode ser industrializado na forma de conserva (Porto-Foresti et al., 2005).

No âmbito zootécnico são animais de pequeno porte (Silveira e Vaz dos Santos, 2015), se adapta bem a variados ambientes. É onívoro (Sato et al., 2006), se adapta facilmente ao treinamento alimentar com rações extrusadas, com bom potencial para aquicultura. Essa boa adaptação e desenvolvimento promovem características interessantes como, altamente prolífico, sua desova pode ser total ou parcial (Sato et al., 2006).

Além disso o lambari-do- rabo-amarelo se apresenta como uma excelente modelo para pesquisa em reprodução de peixes, justamente por apresentarem capacidade de manutenção vitelogênica durante o ano todo nas pisciculturas. A reprodução induzida do lambari ocorre por intermédio de sistema semi-natural (Abreu et al., 2020; Lira et al., 2018; Brambila-Souza et al., 2019), por se tratar de animais de pequeno porte, o

manuseio se torna difícil, podendo acarretar em alta taxas de mortalidades na reprodução por extrusão, diante disso a melhor alternativa é o sistema semi natural. Os reprodutores passam pela captura e são escolhidos de acordo com as características corporais de maturação reprodutiva, apresentando dimorfismo sexual ventre abaulado nas fêmeas, e nadadeira anal bem áspera nos machos. São feitas induções hormonais, colocadas em caixas ou até mesmo nos tanques de piscicultura, o valor de hora grau vai variar de acordo com o hormônio exógeno utilizado (Abreu et al., 2020).

A reprodução de peixes reofílicos fora do ambiente natural ainda é limitada, devido a dependência de estímulos do ambiente (fotoperíodo, pluviometria, temperatura da água) e o uso de indutores hormonais que sejam efetivos a todos os animais para maturação final, e por consequência desova e aumento do volume de sêmen. Diante disso, é importante que mais pesquisas sejam feitas testando indutores hormonais para desenvolvimento de protocolos efetivos. O lambari com todas suas características zootécnicas e de rápida maturação sexual, pode ser utilizado como modelo experimental para aprimorar os protocolos de reprodução induzida baseada em espécies nativas no Brasil.

2.1 Reprodução em peixes migradores

A maioria das espécies de peixes nativas, apresentam potencial produtivo para a aquicultura, realizam o processo de migração para as cabeceiras e nascentes dos rios em busca de água de boa qualidade para reprodução (Paulino et al., 2011). Em sistema de cultivo em viveiros escavados, a migração não é possível, o que impede a maturação final desses oócitos e ovulação. Dessa forma os ovários de acordo com os estímulos ambientais, conseguem atingir o estágio de vitelogênese completa, ocorrendo maturação completa dos oócitos, entretanto sem sua liberação (Zaniboni-filho e Nuñez, 2004). Caso não tenham estímulos ambientais, ou aconteça um manejo inadequado, ou qualquer situação que cause estresse a esse animal, acontecerá o processo de atresia folicular (Murgas et al., 2009).

Para reprodução dos peixes migradores, nas pisciculturas, fora do ambiente natural (riachos e rios), para produção dos alevinos, são utilizados indutores hormonais, podendo ser sintéticos ou no caso do EHC (Extrato de hipófise de Carpa) de um peixe doador, para conseguir fazer a maturação final dos oócitos e fazer com que esses reprodutores ovulem para produção de formas jovens (alevinos).

2.1.1 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas

A reprodução de peixes teósteles é regulada por sistema neuroendócrino e acionam neuromodulações no eixo hipotálamo-hipófise-gonadas, que são induzidos por fatores externos. O ambiente exerce fundamental função nesse processo, os peixes captam as mudanças no ambiente como fotoperíodo, temperatura e período de chuva e alterações químicas na água (Kubitza, F., 2017) que são percebidos pelos peixes através do sistema sensorial e direcionados ao sistema nervoso central (Yaron e Levavisivan, 2011). Essa sincronia com os sinais ambientais garante que a eclosão e o desenvolvimento larval, aconteçam em períodos propícios (Almeida., 2013).

O GnRH é um hormônio produzido pelo hipotálamo, incita a hipófise anterior a liberar LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante), enquanto a dopamina a inibe a liberação (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007). O FSH está envolvido na regulação dos estágios iniciais, liberação de estradiol pelo ovário, desenvolvimento das gônadas, pela gametogênese e pela entrada de vitelogenina no ovócito (vitelogênese) em fêmeas e na espermatogênese nos machos, frequente no plasma por todo ciclo, assim que esse processo se finda, os níveis de FSH no plasma são reduzidos. Já o LH é essencial para a maturação final dos gametas, como maturação e ovulação em fêmeas e espermiogênese e espermiacção em machos, e sua subsequente liberação. (Sallum, 1999; Hafez, 2004; Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007).

No centro de coordenação de estímulos externos e fatores internos está a kisspeptina, produzida por neurônios hipotalâmicos. Depois do estímulo da Kisspeptina o GnRH, estimula as células gonadotrópicas da adeno-hipófise a liberar FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante). Assim essas gonadotropinas estimulam a esteroidogênese por meio de uma elaborada via de enzimas específicas (Baldiasseroto et al., 2014). De maneira resumida, as gonadotropinas nas fêmeas, o FSH e o LH, se locomovem através do fluxo sanguíneo até os ovários, exercendo influência sobre as células foliculares dos ovócitos em desenvolvimento. Já nos machos em idade de maturação sexual, o FSH e LH estimulam a espermatogênese e esteroidogênese testicular (Baldiasseroto et al., 2014).

Nos machos, o FSH é responsável pelo aumento espermatogonial, por intermédio via células de Sertoli, identificada por ser a primeira fase da espermatogênese. A espermatogênese ocorre no interior de estruturas denominadas espermatocistos, ou apenas cistos, que se formam quando uma espermatogônia indiferenciada é

completamente envolvida pelos prolongamentos das células de Sertoli.(Schulz et al., 2010). Em contrapartida o FSH por sua vez, impulsiona receptores da célula de Leydig, incentivando a produção e liberação de andrógenos. Durante essa fase inicial o principal andrógeno produzido pelos testículos dos peixes, é a testosterona (Almeida, 2013; Honji et al., 2020).

Essa atividade esteroidogênica do FSH é uma singularidade dos peixes e acentua com o decorrer da meiose. Com a espermiogênese e liberação dos espermatozoides no lúmen nos túbulos seminíferos, próximo a maturação final outro andrógeno (11-cetotestosterona) apresenta-se em altos picos e ainda mais potente em ativação de receptores. A progesterona por sua vez realiza funções durante a maturação final, incentivando meiose, espermiogênese e hidratação dos espermatozóides (Almeida, 2013; Honji et al., 2020)

2.2.2 Principais indutores utilizados na reprodução induzida de peixes

O método mais difundido no Brasil, para reprodução induzida de peixes reofílicos é o uso de extrato de hipófise de carpa, conhecido como hipofização (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007). A ação da hipófise é direcionada as gônadas, e dessa forma estimulam os ovários a secretarem hormônios para a maturação final dos ovócitos e por fim essas fêmeas aptas consigam desovar (Viveiros et al., 2011). As dosagens podem variar em relação ao estágio de maturação dos animais, bem como o intervalo entre as doses.

Apesar de ser uma técnica bem difundida, apresenta alguns problemas em relação aos seus efeitos, como a porcentagem de reprodutores que podem não reagir de maneira positiva, ovulação parcial e retenção de oócitos, variabilidade na concentração hormonal (pode variar de acordo com o estágio de maturação do peixe doador), potencial transmissão de doenças (Souza et al., 2018)

Os hormônios sintéticos apresentam benefícios quando comparado às gonadotrofinas das hipófises, tais como: indução da maturação gonadal, diminuição do risco de transmissão de doenças para as matrizes, ausência de resposta imune, melhoria na correlação das funções fisiológicas que influenciam diretamente sistema endócrino (Zohar e Mylonas, 2001), além de diminuir custos, induz a maturação final em peixes (Andrade et al., 2014).O hormônio liberador de Gonadotrofina (GnRH) pode ser considerado um indutor reprodutivo mais adequado para as espécies reofílicas, tendo em

vista que não proporciona os efeitos deletérios causado pelo extrato de hipófise de carpa. Como a oscilação do número de fêmeas que responderão positivamente a aplicação de CPE, a ovulação percentual dos ovários e a retenção dos oócitos maduros na papila urogenital das fêmeas (Pereira et al., 2016; Pereira et al., 2018; Souza et al., 2020).

Além disso, o extrato de hipófise de carpa apresenta alguns questionamentos quanto a utilização na aquicultura (Martins et al., 2017), tais como: não apresenta concentração padronizada de gonadotrofinas por ser dependente do grau de maturação em que se encontrava o peixe doador da hipófise (Woynarovich e Horváth, 1989; Harvey e Carolsfeld, 1993; Baldisserotto, 2002), o que pode gerar resultados inconsistentes na reprodução (Evans e Claiborne, 2006); pode desenvolver alguma reação imune as gonadotrofinas e a outras proteínas presentes no extrato de hipófise de carpa (Mylonas et al., 2017); possibilidade de hormônios não gonadotrópicos presentes que podem causar efeitos deletérios ou modificar o efeito das gonadotrofinas (Hoar et al., 1983); possibilidade de transmissão de doenças do doador para o peixe receptor (Zohar e Mylonas, 2001; Evans e Claiborne, 2006; Lokman et al., 2015; Mylonas et al., 2017).

Resultados positivos para tambaqui têm sido evidenciados com a utilização do GnRH associado com inibidores de dopamina (Ovopel®), com 100% de desova com dosagem única (Souza et al., 2018), mostrando ser uma alternativa interessante para a espécie. Assim como outros indutores como acetato de buseralina (Chaopaknam et al., 1994; Paulino et al., 2011; Chaves-Moreno, et al., 2012; Ashraf e Akar, 2013; Mousa et al., 2018; Konzen-Freitas, et al 2020), Ovopel® (Das, S. K, 2004; Jamróz et al., 2004; Źarski et al., 2009; Cejko e Brzuska, 2017; Martins et al., 2017; Souza et al., 2018), Ovaprim® (Nuraini et al., 2017), gonadotrofina coriônica humana e Ovaprim® (Zadmajid, V., 2016), gonaderalina (Felizardo et al., 2012; Bernardes Júnior et al., 2017). Os GnRH atuam no início da cadeia hormonal e induzem o peixe a produzir sua própria gonadotropina, descartando problemas causados por gonadotrofina de outro doador. Além de não serem específicas para cada espécie, sendo assim fáceis de serem sintetizadas, estáveis e não variam a concentração hormonal (sendo efetivas mesmo em pequenas doses) (Harvey e Carolsfeld, 1993).

O análogo de GnRH é expressivamente mais barato, é uma molécula simples de fácil síntese, ao passo que mais fornecedores entrarem no mercado, a tendência é

de queda de preço em função da oferta de produtos. É fato que as gonadotropinas extraídas de outros animais continuarão com preços mais elevados em relação aos hormônios sintéticos, já que a extração exige muito trabalho de coleta (Harvey e Carolsfeld, 1993).

A Kisspeptina é um neuropeptídeo tem função de regulação neuroendócrina da reprodução, sugere-se igualmente que a Kisspeptina induz a liberação de GnRH de maneira semelhante como acontece em mamíferos (Parhar et al., 2004). No centro de coordenação dos estímulos ambientais e dos estímulos internos está a Kisspeptina, que é produzida por neurônios hipotalâmicos. Após estimulação feita pela Kiss, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) influencia a liberação de LH e FSH pelas células gonadotrópicas da Hipófise. As gonadotropinas vão atuar tanto nas gônadas femininas e masculinas, estimulando produção dos gametas e estereoidogênese gonadal (figura 01) Baldisseroto et al., 2014.

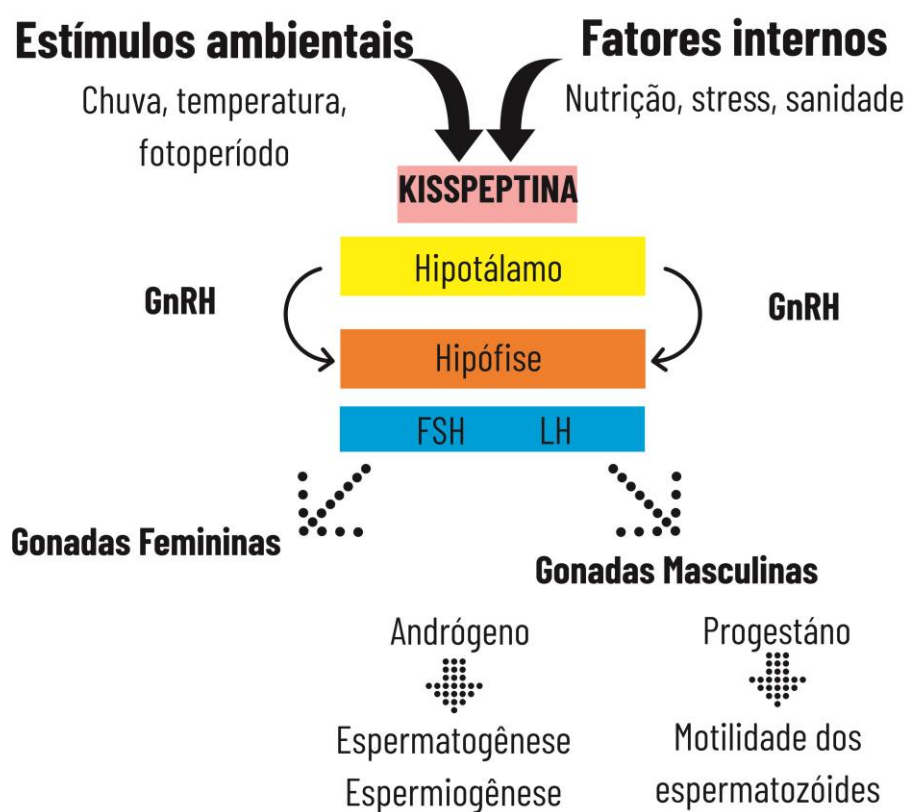


Figura 2: Desenho esquemático do eixo hipotálamo-hipofisário em peixes, adaptado de Baldisseroto et al., 2014.

O Kisspeptina 10, que por sua vez é um neurotransmissor que atua em influência, quanto em controle neuroendócrino de funções reprodutivas. É considerado uma chave

para o GnRH, permitindo correlacionar sinais ambientais e do metabolismo, com o eixo reprodutivo. Entretanto, ainda não são conclusivos os efeitos em peixes, entretanto a Kisspeptina induz a liberação de GnRH da mesma forma que ocorre em mamíferos (Baldisserto et al., 2014).

Apesar de todos os métodos descritos levarem a um denominador em comum, que é a produção de alevinos, precisamos continuar pesquisando a respeito de protocolos que podem aumentar ainda mais a produção desses peixes, com ajustes ou até mesmo criação de novos protocolos. Diante disso esse trabalho busca avaliar a eficiência de doses de Kisspetideo na reprodução induzida de *Astyanax Lacustris*.

2.1.3 Características de análise espermática – casa

O CASA (Computer-assisted Sperm Analysis) é um sistema computadorizado e automático de captura e análise objetiva de sequência de fotos dos espermatozoides, quando mescladas, formam um filme com a trajetória de cada célula. Diante do funcionamento desse sistema, por esse sistema é possível obter informações mais acuradas da movimentação de cada célula espermática (Amann e Kartz, 2004; Bergstein et al., 2014).

VAP –velocidade do percurso médio ($\mu\text{m/s}$); velocidade calculada considerando o percurso médio, desprezando-se os pequenos deslocamentos do percurso do espermatozoide. O percurso é uma curva única ligando o ponto inicial e o final durante a captura da imagem, mas acompanhando o percurso real.

VSL –velocidade linear ($\mu\text{m/s}$). O percurso considera uma linha reta entre o ponto inicial e o final durante a captura da imagem.

VCL –velocidade curvilinear ($\mu\text{m/s}$). É a distância total considerando todos os deslocamentos no percurso da célula durante a captura da imagem. É a velocidade do percurso real do espermatozoide com todas as curvas realizadas durante o tempo de avaliação.

ALH –amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm). Corresponde à largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento.

BCF –frequência de batimentos do flagelo (Hz). É determinada pela medida da frequência com que a linha da cabeça espermática atravessa a trajetória celular em qualquer direção.

STR – retilinearidade (%). É a medida do afastamento do percurso médio da célula espermática considerando-se uma linha reta. É calculada pela relação entre $(VSL/VAP)*100$. Avalia a proximidade do percurso médio da célula a uma linha reta. Quando STR é 100% o percurso médio é uma reta.

LIN – linearidade (%). É a medida do afastamento do percurso real da célula espermática considerando-se uma linha reta. É a razão entre $(VSL/VCL)*100$. Avalia a proximidade do percurso real da célula a uma linha reta. Quando LIN é 100% o percurso real é uma reta e a célula não faz deslocamentos laterais no percurso, não há oscilações.

WOB - Oscilação (%). É a medida do afastamento do percurso real da célula espermática considerando-se o percurso médio (curva), o qual despreza as oscilações, É a razão entre $(VAP/VCL)*100$. Avalia a proximidade do percurso real da célula a uma curva, o percurso médio. Quando WOB é 100% o percurso real é uma curva e a célula não faz deslocamentos laterais no percurso, não há oscilações.

3.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, F. L. (2013). Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. *Revista Brasileira De Reprodução Animal*, 37(2), 174–180.
- Amann, R. P., & Katz, D. F. (2004). Andrology lab corner*: Reflections on casa after 25 years. *Journal of andrology*, 25(3), 317-325.
- Ashraf, M. A., & Akar, A. M. (2013). Spawning induction in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) using carp pituitary extract (CPE) alone, receptal (Buserelin acetate) and cystorelin (GnRh) with or without Dopamine antagonists. In *Proceedings of the 6th Global Fisheries and Aquaculture Research Conference, Hurghada, Egypt, 27–30 September 2013*, 137–148.
- Baldisserotto, B., Cyrino, J. E. P., e Urbinati, E. C. (2014). Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. FUNESP, Jaboticabal.
- Bernardes Júnior, J., Bombardelli, R., & Nuñez, A. (2017). Gonadorelin increases semen production and does not affect its quality in *Leporinus obtusidens*. *Animal Reproduction Science*, 185, 154-160.
- Bergstein, T. G., Weiss, R. R., & Bicudo, S. D. (2014). Técnicas de análise de sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 38(4), 189-194.
- Brambila-Souza, G., Mylonas, C. C., Mello, P. H., Kuradomi, R. Y., Batlouni, S. R., Tolussi, C. E., e Moreira, R. G. (2019). Thermal manipulation and GnRHa therapy applied to the reproduction of lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae* females (Characiformes: Characidae) during the non-breeding season. *General and Comparative Endocrinology*, 279, 120-128.
- Cejko, B., & Brzuska, E. (2017). Differences in the effectiveness of reproduction among ten breeding strains of the common carp *Cyprinus carpio* L. after stimulation of ovulation with carp pituitary homogenate or [(D-Ala6, Pro9NET) mGnRH-a metoclopramide] (Ovopel). *Aquaculture Research*, 48(5), 2221-2230.
- Claiborne, J. B., e Evans, D. H. (Eds.). (2006). *The physiology of fishes*. Local: CRC, Taylor e Francis.
- Chaopaknam, B., Chumnongsittathum, B., & Nagachinta, A. (1994). Induced breeding of Striped tiger nandid *Pristolepis fasciatus* (Bleeker). In *Proceeding of the Seminar on Fisheries 1993 Department of Fisheries, Bangkok (Thailand), 15-17 Sep 1993*.

- Chaves-Moreno, L. C., Chacón-Rodríguez, L., Lozada-Morales, J., Motta-Delgado, P. A., & Murcia-Ordóñez, B. (2012). Evaluation in cachama (*Piaractus brachipomus*) of induced reproduction of with busserelin acetate. *Veterinaria y Zootecnia*, 6(1), 47-55.
- Das, S. K. (2004). Evaluation of a new spawning agent, Ovopel in induced breeding of Indian carps. *Asian Fish Sci*, 17(4), 313-22.
- Eschmeyer, W. N., Fricke, R., & Van der Laan, R. (2017). Catalog of fishes: genera, species, references. San Francisco: California Academy of Science; 2017 [updated 2017 Jan 31; cited 2017 Feb 24]. Available from: Available from: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>
- FAO (Food e Agriculture Organisation). (2022). The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Sofia. <https://www.fao.org/publications/sofia/en/>
- Felizardo, V., Murgas, L., Andrade, E., López, P., Freitas, R., & Ferreira, M. (2012). Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). *Theriogenology*, 77(8), 1570-1574.
- Garutti, V., e Britski, H. A. (2000). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS, Série Zoologia*, 13, 65-88.
- Garutti, V. (2003). *Piscicultura ecológica*. Unesp.
- Hafez, E. S. E.; Hafez, B.(2004) **Reproduction animal**. 7ed., Barueri: Manole, 515 p.
- Harvey, B., e Carolsfeld, J. (1993). *Induced breeding in tropical fish culture*. IDRC, Ottawa, ON, CA. Baldisserotto, B. (2002). *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura* (p. 212). Santa Maria: UFSM.
- Harvey, B., e Carolsfeld, J. (1993). *Induced breeding in tropical fish culture*. IDRC, Ottawa, ON, CA. 144 p.
- Hoar, W. S. and D. J. Randall. 1978. Fish physiology, Vol. 7. Academic Press, New York.
- HONJI, R. M., ARAÚJO, B. C., & MOREIRA, R. G. (2020). Fisiologia reprodutiva aplicada ao cultivo de peixes neotropicais. *Ci. Anim.*, 123-137.
- Jamróz, M., Kucharczyk, D., Hakuć-Błażowska, A., Krejszeff, S., Kujawa, R., Kupren, K., ... & Glogowski, J. (2008). Comparing the effectiveness of Ovopel, Ovaprim, and LH-RH analogue used in the controlled reproduction of ide, *Leuciscus idus* (L.). *Fisheries & Aquatic Life*, 16(4), 363-370.

- Lira, L. V. G., Kuradomi, R. Y., Souza, T. G. D., Hainfellner, P., e Batlouni, S. R. (2018). Astyanax altiparanae o varian maturation after spawning in water recycling systems. *B. Inst. Pesca*, e207-e207.
- Lokman, P. M., Wylie, M. J., Downes, M., Di Biase, A., Damsteegt, E. L. (2015). Artificial induction of maturation in female silver eels, *Anguilla australis*: The benefits of androgen pre-treatment. *Aquaculture*. 437:111-119. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.11.026
- Martins, E. D. F. F., Streit Jr, D. P., de Abreu, J. S., Corrêa-Filho, R. A. C., de Oliveira, C. A. L., Lopera-Barrero, N. M., e Povh, J. A. (2017). Ovopel and carp pituitary extract for the reproductive induction of *Colossoma macropomum* males. *Theriogenology*, 98, 57-61.
- Mousa, M. A., Kora, M. F., & Khalil, N. A. (2018). Evaluation of the effectiveness and cost of different hormones in stimulating the spawning of thin lipped grey mullet, *Liza ramada*. *Egyptian Journal of Histology*, 41(3), 275-284.
- Murgas, L. D. S., Drumond, M. M., Pereira, G. J. M., e Felizardo, V. D. O. (2009). Manipulação do ciclo e da eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. *R. bras. Reprod. Anim.*, 70-76.
- Mylonas, C. C., Duncan, N. J., e Asturiano, J. F. (2017). Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. *Aquaculture*, 472, 21-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.021>.
- Nuraini, N., Tanjung, A., Warningsih, T., & Muchlisin, Z. (2017). Induced spawning of siban fish *Cyclocheilichthys apogon* using Ovaprim [version 1; peer review: 2 approved, 1 approved with reservations]. *F1000 Research*, 6, 1855.
- Parhar, I. S., Ogawa, S., e Sakuma, Y. (2004). Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology*, 145(8), 3613-3618. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0395>
- Paulino, M., Miliorini, A., Solis Murgas, L., Mendonca de Lima, F., & Felizardo, V. (2011). REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF PACU, PIRACANJUBA AND CURIMBA INDUCED BY BUSERELINE EXTRACT. *Boletim Do Instituto De Pesca*, 37(1), 39-45.
- Porto-Foresti, F., Oliveira, C., & Foresti, F. (2005). First chromosome characterization in the Neotropical eel, *Gymnothorax ocellatus* (Pisces, Muraenidae). *Cytologia*, 70(3), 283-286.sa

- Roza de Abreu, M., Silva, LMDJ, Figueiredo-Ariki, DG, Sato, RT, Kuradomi, RY, e Batlouni, SR (2021). Desempenho reprodutivo de lambari (*Astyanax altiparanae*) em sistema seminatural utilizando diferentes protocolos. *Aquaculture Research*, 52 (2), 471-483. <http://dx.doi.org/10.1111/are.14905>.
- Sallum, W. B. (1999). Reprodução das principais espécies de peixes. *Lavras, UFLA/FAEPE*, 74p.
- Sato, Y., Sampaio, E. V., Fenerich-Verani, N., e Verani, J. R. (2006). Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23, 267-273. <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1590/S0101-81752006000100021>
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 390-411.
- Silveira, E. L., e Vaz-dos-Santos, A. M. (2015). Length-weight relationships for 22 neotropical freshwater fishes from a subtropical river basin. *Journal of Applied Ichthyology*, 31(3), 552-554. <https://doiorg.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jai.12699>
- Souza, F. N., Martins, E. D. F. F., Corrêa Filho, R. A. C., de Abreu, J. S., Pires, L. B., Streit Jr, D. P., ... e Povh, J. A. (2018). Ovopel® and carp pituitary extract for induction of reproduction in *Colossoma macropomum* females. *Animal reproduction science*, 195, 53-57.
- Sussel, F. R. (2015). Lambari: Pequeno no tamanho, grande no potencial. *Panorama da Aquicultura*, 25, 50– 53.
- Viveiros, A. T. M., Leal, M. C., Sallum, W. B. (2011). Reprodução das Principais Espécies de Peixes Nativos/ Ana Tereza de Mendonça Viveiros. Lavras: UFLA/FAEPE. 94p.: il. – Curso de Pós-Graduação "Lato Sensu" (Especialização) a Distância : Piscicultura.
- Zadmajid, V. (2016). Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and Ovaprim™ (sGnRHa domperidone) on the reproductive characteristics of wild-caught male Longspine scraper, *Capoeta trutta* (Heckel, 1843). *Aquaculture*, 463, 7-15.
- Zaniboni-Filho, E., Nuñez, A. P. O. (2004). Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt, p. 45-73.

- Żarski, D., Kucharczyk, D., Targońska, K., Jamróz, M., Krejszeff, S., & Mamcarz, A. (2009). Application of ovopel and ovaprim and their combinations in controlled reproduction of two reophilic cyprinid fish species. *Polish Journal of Natural Sciences*, 24(4), 235-244.
- Zohar, Y., e Mylonas, C. C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. In *Reproductive biotechnology in Finfish aquaculture* (pp. 99-136). Elsevier.
- Yaron, Z, Levavi-sivan, B. (2011). Endocrine Regulation of Fish Reproduction. *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. 2: 1500-1508.
- WOYNAROVICH, E., e HORVÁTH, L. (1989). A propagação de peixes de águas tropicais: manual de extensão. *Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq*
- de Moura Muniz, J. A. S., de Almeida Catanho, M. T. J., & dos Santos, A. J. G. (2008). Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). *Boletim do Instituto de Pesca*, 34(2), 205-211.
- Andrade, E. S., Carvalho, A. F. S., Ferreira, M. R., Paula, F. G., Rodrigues, F. S., Felizardo, V. O., ... & Murgas, L. D. S. (2014). Indutores hormonais na reprodução artificial de curimba (*Prochilodus lineatus*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 38, 230-236.

ARTIGO

Qualidade seminal de machos de lambari (*Astyanax lacustris*) induzidos com o hormônio Kisspeptina.

RESUMO

O objetivo do estudo é avaliar a qualidade seminal de reprodutores de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) induzidos com diferentes níveis de kisspeptina. Foram utilizados 49 machos em idade reprodutiva. Foram avaliados três níveis de kisspeptina: 0,020, 0,050 e 0,080 mg/kg de peso vivo em dose única. Adicionalmente, foi avaliado um grupo de peixes induzidos com o protocolo padrão com extrato de hipófise de carpa – EHC (2,5 mg/kg em dose única) e um grupo em que foi aplicado soro fisiológico. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento, exceto para solução salina que foi utilizado 8. O sêmen foi coletado após as 270 horas-graus para o grupo de peixes que recebeu kisspeptina e 160 horas-grau para o grupo induzido com EHC e soro fisiológico. A concentração de espermatozoides não diferiu entre os diferentes tratamentos (entre $0,8 \times 10^9$ e $1,03 \times 10^9$ espermatozoides/mL). Os valores de motilidade total foram maior ($P < 0,05$) nos peixes induzidos com EHC (28,8%) em relação aos peixes induzidos com os diferentes níveis de kisspeptina (entre 13 e 14,7%) e com soro fisiológico (13,2%). O mesmo comportamento foi observado para as variáveis velocidade curvilinear, velocidade média de percurso, amplitude do movimento lateral da cabeça e frequência de batimento flagelar, em que foram obtidos maiores ($p < 0,05$) valores para os peixes induzidos com EHC. Por outro lado, as variáveis coeficiente de linearidade, coeficiente de retilinearidade e oscilação média da trajetória espacial do espermatozoide foram maiores ($P < 0,05$) nos peixes induzidos com EHC em relação aos induzidos com 0,02 e 0,08 de kisspeptina e o controle negativo,

mas não diferiu do nível de 0,05 mg/kg. Conclui-se que as concentrações de kisspetina (0,020, 0,050 e 0,080 mg/kg) utilizadas na reprodução induzida não resultaram em boa qualidade seminal de machos de lambari-do-rabo-amarelo.

1.0 INTRODUÇÃO

Pesquisas sobre espécies nativas devem ser fomentadas para haja aporte de informações para desenvolvimento de pacotes tecnológicos que viabilizem as criações. Aumentos de produtividade e um bom custo-benefício das tecnologias são fundamentais para a sustentabilidade das criações.

Um dos grandes entraves na criação dos peixes nativos está na ausência de protocolos específicos de reprodução das espécies reofílicas, que permitam melhorar a eficiência reprodutiva, aumentar a intensidade de utilização dos reprodutores no ano e, principalmente, evitar a mortalidade dos peixes, situação comum atualmente em algumas espécies após a indução reprodutiva. A maioria dos peixes nativos tem sua maturação sexual por volta do terceiro a quarto ano de vida, por consequência se tornam animais de porte grande, o que dificultam as pesquisas por conta de custo de obtenção, manutenção e indução das matrizes. Diante disso, o lambari se torna uma excelente alternativa como espécie modelo para as pesquisas, por ter pequeno porte e rápida maturação sexual (quatro meses de idade) (Abreu et al., 2020).

A metodologia para reprodução induzida utilizada atualmente em peixes nativos é praticamente a mesma da década de 70, com a utilização de extrato de hipófise de carpa (Neto et al., 1946). No entanto este protocolo além de não ser totalmente eficiente, tem recebido questionamentos nos últimos anos (Konzen-Freitas et al., 2020). Neste contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos alternativos para o lambari,

no intuito de serem replicados e adaptados aos outros peixes reofílicos, buscando melhorar a eficiência reprodutiva das espécies nativas.

O objetivo deste estudo é avaliar a qualidade seminal de reprodutores de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) induzidos com diferentes níveis de kisspeptina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e peixes

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Piscicultura da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (20°29'58.2" S e 54°36'52.3" O), localizada na Cidade Universitária em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, no início do outono do hemisfério sul (10, 11 e 12/04/2022). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS (1083/2019).

Durante a fase de preparação do lote de reprodutores para o experimento, os peixes foram mantidos em um tanque escavado de 165 m², tendo uma renovação de água de 10% ao dia. Foram alimentados com ração extrusada (Marca Supra[®]: com matéria seca 88%, proteína bruta 32%, extrato etéreo 6%, matéria fibrosa 6%, matéria mineral 13%, cálcio 3,0%, fósforo 0,9% e energia digestível 3000 kcal / kg), fornecida taxa de arraçamento de cerca de 1% da biomassa ao dia.

2.2 Delineamento experimental

Foram selecionados 50 machos de lambari de um tanque na Piscicultura da Estação Experimental, de acordo com as características reprodutivas evidenciadas, conforme recomendado por (Zaniboni Filho e Weingartner., 2007). Os animais foram selecionados e transportados em baldes de 20 litros com água do viveiro, com destino

ao laboratório. No laboratório foram alocados em duas caixas de 500 litros, com aeração contínua, e depois separados aleatoriamente para os tratamentos.

Para indução reprodutiva, os peixes foram pesados e distribuídos de maneira aleatória em cinco caixas de 310 litros. Os 10 peixes de cada caixa receberam o mesmo tratamento (um dos três níveis de kisspeptina, ou o controle negativo com soro fisiológico e ou o controle com extrato de hipófise de carpa) (Figura 02). Cada reprodutor foi considerando uma repetição.

Todas as caixas onde foram alocados os reprodutores de cada tratamento tinham um sistema de aeração. Não houve renovação de água nas caixas, apenas aeração constante, temperatura 27,0 °C, pH 7,40 e oxigênio dissolvido médio foi 9,9 mg/l.

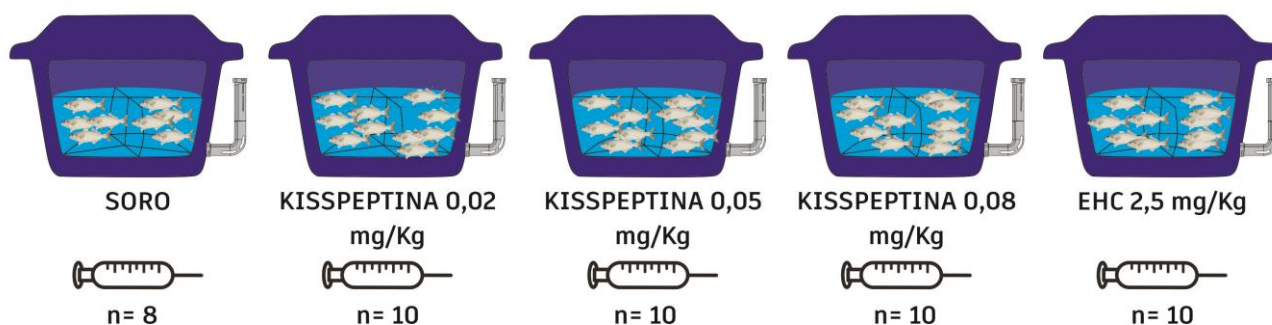


Figura 3 - - Ilustração do sistema com divisão em caixas por tratamento, subdivididas em lotes.

Os machos foram submetidos a diferentes níveis de kisspeptina com posologia de 0,02;0,05;0,008 mg/kg de peso vivo em uma dose via injeção intraperitoneal. Em outro tratamento foram utilizadas duas aplicações de injeção intraperitoneal de EHC com a dose de 2,5 mg/kg de peso corporal para controle positivo (10% na primeira aplicação e 90% na segunda dose, com 12 horas de intervalo entre elas). Adicionalmente 08 animais foram submetidos a uma injeção intraperitoneal somente com soro fisiológico com única aplicação, assim como para a Kisspeptina com as diferentes posologias. Foram

utilizadas 10 repetições para cada tratamento, com exceção da solução salina que apenas 8 machos liberaram sêmen.

As horas-grau para coleta de esperma foram mensuradas por meio de monitoramento da temperatura da água, com termômetro de mercúrio, começando a partir da aplicação do tratamento com Kisspeptina (aplicação única) 270 horas-grau, e a partir da aplicação da segunda dose de EHC com 160 horas-grau.

2.3 Coletas amostrais

Após 270 horas grau da aplicação única de kisspeptina, e após segunda aplicação de EHC com 160 horas grau, foi realizada extrusão através de massagem abdômen caudal. O sêmen foi coletado através de micropipeta de precisão e depositado em um eppendorf e em sequência diluídos em Beltsville Thawing Solution - BTS® na proporção de 1:1, de acordo com a metodologia adaptada (Yasui et al., 2015). A diluição em BTS® foi realizada criteriosamente para análise do sêmen fresco, para evitar ativação precoce, por urina ou qualquer resquício de água que pudesse comprometer as análises.

2.4 Variáveis de qualidade seminal

Para a análise espermática computadorizada assistida (CASA), as amostras foram previamente mantidas resfriadas em caixas de isopor a 4°C sem contato direto com o gelo para transporte. No laboratório, a análise foi realizada pelo método computadorizado CASA (Computer Assisted Semen Analysis - modelo Sperm Class Analyzer – SCA) usando uma configuração específica para análise de sêmen de peixes. As amostras permaneceram por dois minutos aquecendo e estabilizando a 36°C para assim retirar uma alíquota de 10 microlitros, que foi colocada em câmara de contagem de células makler®. As alíquotas foram ativadas com água destilada na proporção de

1:1 e o momento de avaliação foi fixado em 10s pós ativação. Através desta metodologia foi possível avaliar taxa de motilidade espermática total (MOT Total %), velocidade curvilinear (VCL $\mu\text{m s}^{-1}$), velocidade média de percurso (VAP $\mu\text{m s}^{-1}$), velocidade em linha reta (VSL $\mu\text{m s}^{-1}$), retilinearidade (STR %), oscilação (WOB %), linearidade (LIN %), frequência de batimento transposto (BCF Hz) e número de espermatozoides por 100 (SPTZs).

Para as análises de citometria de fluxo, para as variáveis: PI – (Membrana plasmática íntegra), PI + (Membrana plasmática íntegra), Sptz Marcado. Os procedimentos foram realizados utilizando o equipamento CytoFLEX™ (Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA) equipado com laser azul (488 nm, 100 mW), vermelho (640 nm, 40 mW) e violeta (405 nm, 100 mW) e os dados foram analisados por meio do software CytExpert Acquisition (Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA). Para a leitura no citômetro de fluxo, todas as amostras de sêmen foram diluídas a uma concentração de 5×10^6 espermatozóides mL^{-1} em solução tampão TALP-PVA (100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO_3 , 0,3 mM NaH_2PO_4 , 21,6 mM DL 60% de lactato de sódio, 2,0 mM de CaCl_2 , 0,4 mM de MgCl_2 , 10,0 mM de Hepes, 1,0 mM de piruvato de sódio e 1,0 mg mL^{-1} de álcool polivinílico-PVA) de acordo com Carneiro et al. (2018), seguido de 7 μM de Hoechst 33342 (H33342; Thermo Scientific, Fisher, IL, EUA – H1399). Essa combinação foi importante para descartar as partículas não celulares nas amostras.

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática MTS- (Baixo potencial mitocondrial), MTS+ (Alto potencial mitocondrial), PI+MTS+ (Membrana plasmática lesada com alto potencial mitocondrial), PI+MTS- (Membrana plasmática lesada com baixo potencial mitocondrial), PI-MTS- (Membrana plasmática íntegra com baixo potencial mitocondrial), foi utilizada a sonda fluorescente iodeto de propídio (PI; Sigma-Aldrich

Co., Saint Louis, Missouri, EUA – P4170), as células intactas não são coradas pelo reagente. Adicionou-se ao tubo com a amostra a alíquota de 2 µL (50 µg/mL) de PI e, no mesmo tubo, para a avaliação do potencial mitocondrial, foi adicionada 0,2 µL (20 nM) da sonda fluorescente MitoStatus Red (MST; BD Pharmingen™), cuja emissão de fluorescência indica o alto potencial da membrana mitocondrial. A amostra foi incubada por 30 min a 30°C protegida da luz. Ao final desse período, a amostra foi avaliada em citômetro de fluxo para análise da emissão de fluorescência. Em associação ao iodeto de propídio, os espermatozoides foram classificados em membrana plasmática intacta e alto potencial mitocondrial (MTS-, MTS+, PI+MTS+, PI+MTS-, PI-MTS-; expressas em %). Para cada ensaio, pelo menos 10.000 células foram avaliadas pelo citômetro de fluxo para cada amostra. Os dados foram gerados em formato de gráfico de histograma, o que permitiu a visualização de todos os eventos visíveis, devidamente compensados pelo software de citômetro de fluxo própria matriz.

Para determinação de concentração espermática foi diluído 2 µL de solução (BTS® + sêmen 50%) em 2.000 µL de formol salino tamponado (1:2000) a 4,6%. A contagem de células foi realizada de acordo com a metodologia de Sanches et al. (2011), em câmara de hematimétrica de Neubauer. O cálculo foi realizado de acordo com a recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) para sêmen de mamíferos.

2.5 Análises estatísticas

As variáveis dependentes foram submetidas aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e de Levene para homogeneidade de variâncias. Sendo verificado normalidade e homogeneidade de variâncias, as variáveis dependentes foram analisadas por um modelo com uma variável independente (Anova - One Way), seguida do Teste de

Tukey. Cada reprodutor foi considerado como uma unidade experimental e cada tratamento teve de 8 a 10 repetições. Quando não foi verificado normalidade ou homogeneidade de variâncias, foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Dunn. Todas as análises foram feitas seguindo as recomendações de ZAR (2010) e utilizando o Sistema de Análise Estatística (SAS, 2002). O nível de significância utilizado em todos os testes foi de 0,05.

3 RESULTADOS

A motilidade total foi maior ($P < 0,05$) nos peixes induzidos com EHC em relação aos peixes submetidos aos diferentes níveis de kisspeptina e também aos peixes do grupo controle (induzidos com soro fisiológico). O mesmo comportamento foi observado para as variáveis VSL, VAP, ALH e BCF, em que foram obtidos maiores valores ($p < 0,05$) para os peixes induzidos com EHC (Tabela 01).

As variáveis LIN, STR e WOB foram maiores ($P < 0,05$) nos peixes induzidos com EHC em relação aos induzidos com 0,2 e 0,8 de kisspeptina e o controle negativo. Por outro lado, a concentração não diferiu entre os tratamentos (Tabela 01),

As variáveis de integridade de membrana e atividade mitocondrial não diferiram entre os níveis de kisspeptina e EHC e o controle negativo (Tabela 02).

Tabela 1 – Médias ou medianas (postos médios) de **características de qualidade seminal de reprodutores de *Astyanax lacustris*** submetidos a diferentes indutores.

Características	Indutores					CV	Valor P
	0,02 Kiss	0,05 Kiss	0,08 Kiss	EHC	SORO		
CONC (109)	0,89 a	0,80 a	0,93 a	1,03 a ¹	0,99 a	26,31	0,2878
MOT Tot (%)	14,72 (21,15) b	13,01 (23,05) b	13,35 (20,55) b	28,82 (39,70) a ²	13,21 (16,43) b	--	0,0031*
VCL (µm/s)	13,77 b	16,46 b	12,68 b	28,95 a ¹	14,31 b	33,69	<,0001
VSL (µm/s)	9,112 b	12,884 b	8,608 b	24,966 a ¹	8,363 b	44,80	<,0001
VAP (µm/s)	11,132 b	14,661 b	10,618 b	27,231 a ¹	10,346 b	40,12	<,0001
LIN (%)	58725 (19,70) b	74870 (29,00) ab	63715 (16,60) b	86980 (38,70) a ²	56845 (17,00) b	--	<0,0012*
STR (%)	80,10 (19,45) b	81,13 (26,05) ab	72,52 (15,20) b	92,12 (39,60) a ²	79,39 (21,62) b	--	0,0013*
WOB (%)	78,75 (19,00) b	87,48 (30,30) ab	82,00 (18,90) b	94,21 (36,60) a ²	71,65 (16,00) b	--	0,0042*
ALH (µm)	0,00 (19,90) b	0,00 (19,80) b	0,00 (23,00) b	1,05 (40,50) a ²	0,00 (18,00) b	--	<,0001*
BCF (Hz)	0,00 (20,00) b	0,00 (20,10) b	0,00 (22,05) b	7,03 (41,05) a ²	0,00 (18,00) b	--	<,0001*

Nota: CV = Coeficiente de variação; VCL = Velocidade Curvilinear; VSL = Velocidade Linear; VAP = Velocidade Média de Trajetória; LIN = Linearidade; STR = Retilinearidade; WOB = Oscilação; ALH = Amplitude do Movimento Lateral da Cabeça; BCF = Frequência de Batimento Flagelar. Valor P = Valor P da análise de variância ou do Teste de Kruskal-Wallis*. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ou medianas seguidas de letras diferentes diferem pelo Teste de Dunn* (P<0,05).

Tabela 2 - – Medianas (postos) de características de qualidade seminal relacionadas a integridade de membrana plasmática de reprodutores de *Astyanax lacustris* submetidos a diferentes indutores

Características	Indutores					Valor P
	0.02 kiss	0.05 kiss	0.08 kiss	EHC	SORO	
PI- (%)	87,66 (17,65)a,	99,75 (27,10)a	99,68 (26,55)a	99,23 (27,65)a	94,6 (20,62)a	0,3844*
PI+ (%)	12,30 (30,35)a	0,25 (20,90)a	0,32 (21,44)a	0,76 (20,35)a	5,31 (27,37)a	0,3844*
MTS- (%)	97,50 (23,90)a	97,39 (23,10)a	99,39 (33,05)a	97,91 (25,50)a	95,09 (13,18)a	0,0595*
MTS+ (%)	2,50 (24,10)a	2,60 (24,90)a	0,61 (14,94)a	2,08 (22,50)a	4,91 (34,81)a	0,0595*
PI+MTS+ (%)	0,23 (26,85)a	0,15 (24,20)a	0,03 (15,88)a	0,06 (20,94)a	0,52 (29,87)a	0,2235*
PI+MTS- (%)	8,26 (29,00)a	0,05 (19,10)a	0,28 (21,11)a	0,41 (19,75)a	3,96 (25,75)a	0,4063*
PI-MTS- (%)	90,26 (18,90)a	95,95 (21,80)a	92,97 (26,11)a	98,30 (27,87)a	89,48 (21,25)a	0,5906*
PI-MTS+ (%)	0,60 (16,20) a	2,18 (30,20) a	0,56 (17,66) a	0,61 (18,50) a	2,99 (33,00) a	0,0126 ⁽¹⁾

Nota: CV = Coeficiente de variação; PI+ =Membrana plasmática lesada; PI- =Membrana plasmática íntegra; MTS+ =Alto potencial mitocondrial; MTS- =Baixo potencial mitocondrial; PI+MTS+ =Membrana plasmática lesada com alto potencial mitocondrial; PI+ MTS- =Membrana plasmática lesada com baixo potencial mitocondrial; PI- MTS- =Membrana plasmática íntegra com baixo potencial mitocondrial; PI-MTS+ =Membrana plasmática íntegra com alto potencial mitocondrial. Valor P =Valor P do Teste de Kruskal-Wallis*. Medianas (ou postos médios) seguidas de mesmas letras na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Dunn.quando ($P>0,05$). (1) Na variável PI-MTS+ (%) o Teste de Dunn, mais conservador, não encontrou diferenças embora o Teste de Kruskal-Wallis tenha resultado em significativo ($P<0,05$) .

4 DISCUSSÃO

A qualidade espermática dos peixes pode ser diferente por vários fatores, como espécie, período de latência, método de indução hormonal, período do ano e até mesmo diferentes estágios de maturação de indivíduos da mesma espécie (Piironen, J., 1985; Merlano et al., 2011; Golpour et al., 2013). Essas diferenças espermáticas qualitativas podem ser influenciadas por fatores externos como: temperatura, fotoperíodo, contaminação espermática, estresse e regulação hormonal (Cosson et al., 2008 Chiacchio et al., 2017).

A velocidade espermática e a motilidade podem ser consideradas como indicadores de boa qualidade seminal (Kroj, et. al, 2018), e as velocidades por sua vez também corroboram esse fato, por influenciar na fertilização (Gallego et al., 2013; Carneiro-Leite et al., 2020). Uma maior velocidade curvilínea está relacionada ao fato que, os espermatozóides apresentam movimentos mais circulares (Leite et al., 2018) que facilitam a entrada no oócito, enquanto para VSL significa uma trajetória mais regular e em linha reta de locomoção (Chiacchio et al., 2017). Segundo Cejko et al.(2012), altos valores de ALH por sua vez podem indicar condições adequadas de fertilização e maturidade espermática, que por sua vez aumentam suas habilidades de fertilização, para essa característica apenas o EHC apresentou diferença significativa.

Alguns questionamentos quanto a utilização de extrato de hipófise de carpa (EHC) na indução de peixes reofílicos tem ocorrido nos últimos anos (Souza et al., 2018; Konzen-Freitas, et al., 2020), sendo que alguns indutores têm sido testado como alternativa. Este é o primeiro trabalho avaliando kisspeptina em lambari e os resultados deste trabalho mostram que este indutor pode ser utilizado na reprodução induzida de machos de lambari. De acordo com Streit Júnior et al., 2012 a indução com EHC pode aumentar o volume de sêmen produzido e motilidade espermática, entretanto diminui a concentração espermática. Como o volume de sêmen não foi avaliado, esse fato pode justificar ausência de diferença significativa entre os tratamentos, quando comparado ao EHC.

O desenvolvimento de protocolos efetivos para a reprodução de peixes nativos é essencial para um pacote tecnológico para as espécies brasileiras. Além disso, protocolos específicos podem favorecer coletas sucessivas de gametas em um mesmo período reprodutivo, conforme observado em machos e fêmeas de tambaqui (Pires et al., 2017; 2018). Vale ressaltar que a análise em desovas sucessivas em um mesmo período

reprodutivo e em diferentes períodos reprodutivos são importantes para verificação de possíveis efeitos dos hormônios na vida reprodutiva dos machos de lambari.

As características seminais de uma espécie são de grande importância para avaliação e manutenção nas pisciculturas comerciais de reprodução. A concentração de espermatozoides não diferiu entre os diferentes tratamentos (entre 0,8 e $1,03 \times 10^9$ espermatozoides/mL). Os valores de motilidade total foi maior ($P < 0,05$) nos peixes induzidos com EHC (28,8%) em relação aos peixes induzidos com os diferentes níveis de kisspeptina (entre 13 e 14,7%) e com soro fisiológico (13,2%), ainda assim apresentaram valores inferiores aos apresentados por (Carneiro-Leite et al., 2020) com avaliação seminal de *Astyanax lacustris* com sêmen fresco com VCL (51,1 $\mu\text{m/s}$), VSL (41,4 $\mu\text{m/s}$) e VAP (48,2 $\mu\text{m/s}$), valores médios. É importante avaliarmos sempre que a indução hormonal é feita, sempre no intuito de promover maior produção seminal, por consequência facilitar manuseio no sistema de reprodução induzida. Entretanto, a resposta ao estímulo pode variar bastante de espécie para espécie, do hormônio utilizado e do tempo necessário para uma eficaz ação do mesmo (Sanches et al., 2015).

o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) influencia a liberação de LH e FSH pelas células gonadotrópicas da Hipófise. As gonadotropinas vão atuar tanto nas gônadas femininas

A kisspeptina é um hormônio que influencia no controle neuroendócrino na reprodução de peixes, atua como receptora de sinais externos e induz o GnRh, exercendo influência sobre as células gonadotrópicas da hipófise na liberação de de LH e FSH, que vão atuar diretamente nas gônadas femininas e masculinas. Esse sinal é recebido através dos receptores (FSHr e LHr), importantes para a maturação final dos ooócitos (Hatef, A., et al., 2022). Permitindo então que a kisspeptina responda de maneira mais efetiva ao FSH e LH e ajude a induzir a maturação do oócito (Hatef, A., et al., 2022). Este mesmo autor trabalhou com maturação de folículos ovarianos coletados de fêmeas de peixe zebra, induzidos a maturação In-vitro com doses de 10 e 100 ng/ml por 6, 18 e 24 horas. Com a dose de 10 ng/ml obtiveram aumento significativo na maturação dos oócitos com 18 e 24 horas, entretanto com a dose de 100ng/ml foi percebido somente maturação dos ovócitos apenas com 24 horas e não causou alterações em LHr e FSHr nessa dose (100 ng/ml).

Resultados positivos com associação de kisspeptina com GnRH foram encontrados por (Sokoyowska-mikoyajczyk et al., 2018), em seu trabalho quando a combinação dos dois indutores foi registrado aumento significativo da concentração de LH, quando

comparado a administração sozinha de kisspeptina ou de GnRH. Assim podemos afirmar de acordo com os resultados do autor que a kisspeptina tem efeito via cerebral, mesmo quando administrado por via intraperitoneal, o que não exclui seu efeito direto a nível de hipófise.

A integridade de membrana plasmática e o alto potencial mitocondrial estão correlacionados a qualidade espermática e a potencialidade de fertilização dos ovócitos, e por outro lado, altas taxas de lesão na membrana afetam a capacidade de fertilização. As alterações na integridade da membrana plasmática estão associadas com a redução da capacidade de fecundação (PI-MTS+) (Thomas et al., 2006). Quando observamos os valores dessa variável apresentaram valores bem baixos o que condiz com o fato que as características seminais para fertilização dos ovócitos não estavam adequadas de maneira satisfatória.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Piscicultura Água Azul.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que as concentrações de kisspetina (0,020, 0,050 e 0,080 mg/kg) utilizadas na reprodução induzida não resultaram em boa qualidade seminal de machos de lambari-do-rabo-amarelo.

6 - REFERÊNCIAS

- Roza de Abreu, M., Silva, LMDJ, Figueiredo-Ariki, DG, Sato, RT, Kuradomi, RY, e Batlouni, SR (2021). Desempenho reprodutivo de lambari (*Astyanax altiparanae*) em sistema seminatural utilizando diferentes protocolos. *Aquaculture Research* , 52 (2), 471-483. <http://dx.doi.org/10.1111/are.14905>.
- Almeida, F. L. (2013). Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. *Revista Brasileira De Reprodução Animal*, 37(2), 174–180
- Andrade, ES, Carvalho, AFS, Ferreira, MR, Paula, FG, Rodrigues, FS, Felizardo, VO, ... e Murgas, LDS (2014). Indutores hormonais na reprodução artificial de curimba (*Prochilodus lineatus*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal* , 38 , 230-236.
- Arabacı, M., Diler, İ., e Sarı, M. (2004) Induction and synchronisation of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRHa) and its effects on egg quality. *Aquaculture* , 237 (1-4), 475-484.
- Brambila-Souza, G., Mylonas, C. C., Mello, P. H., Kuradomi, R. Y., Batlouni, S. R., Tolussi, C. E., e Moreira, R. G. (2019). Thermal manipulation and GnRHa therapy applied to the reproduction of lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae* females (Characiformes: Characidae) during the non-breeding season. *General and Comparative Endocrinology*, 279, 120-128.
- Camargo, L.S., Freitas-Dell'Aqua, C.P., Schmith, R.A., Guasti, P.N., Volpato, M., Souza, F.F.D., 2017. New multicolor protocol to assessment dog spermatozoa by flow cytometer. *Anim. Reprod.* 14, 311.
- Carneiro, J. A., Canisso, I. F., Bandeira, R. S., Scheeren, V. F. C., Freitas-Dell'Aqua, C. P., Alvarenga, M. A., ... e Dell'Aqua Jr, J. A. (2018). Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability. *Animal reproduction science*, 192, 107-118. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.020>
- Carneiro-Leite, L., Bashiyo-Silva, C., Oliveira, Y. A. A., Borges, L. P., Sanchez, M. P., Silva, L. G. D., ... e Ninhaus-Silveira, A. (2020). Seminal characteristics and sensitivity of *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) sperm to cryoprotective solutions based on dimethylsulfoxide and methylglycol. *Neotropical Ichthyology*, 18.
- Cejko, B. I., K. Targońska, R. K. Kowalski, D. Żarski, B. Sarosiek, D. Kucharczyk, and J. Glogowski. "The Effectiveness of Hormonal Preparations (Ovopel, Ovaprim,

- LHRHa, HCG and CPE) in Stimulating Spermiation in Dace *Leuciscus Leuciscus* (L.)." *Journal of Applied Ichthyology* 28.6 (2012): 873-77. Web.
- Cejko, Beata Irena, Beata Sarosiek, Radosław Kajetan Kowalski, Sławomir Krejszeff, and Dariusz Kucharczyk. "Application of Computer-assisted Sperm Analysis in Selecting the Suitable Solution for Common Carp, *Cyprinus Carpio* L., Sperm Motility." *Journal of the World Aquaculture Society* 44.3 (2013): 466-72. Web.
- Cosson, J., Coward, K., & Rafiee, G. (2008). *Fish spermatology* (pp. 397-460). S. M. H. Alavi (Ed.). Oxford, UK: Alpha Science International.
- Di Chiacchio, I. M., Almeida, I. L., Leal, M. C., e Viveiros, A. T. (2017). Sperm quality and its freezing ability throughout the spawning season in *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. *Theriogenology*, 90, 284-288.
- Gallego, V., Carneiro, P. C. F., Mazzeo, I., Vílchez, M. C., Peñaranda, D. S., Soler, C., ... e Asturiano, J. F. (2013). Standardization of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm motility evaluation by CASA software. *Theriogenology*, 79(7), 1034-1040.
- Garutti, V., e Britski, H. A. (2000). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS, Série Zoologia*, 13, 65-88.
- Golpour, A., Akhoundian, M., Khara, H., Rahbar, M., & Dadras, H. (2013). Changes of sperm quality parameters in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) during spawning migration. *Czech Journal of Animal Science*, 3, 117-124.
- Hatef, A., Rajeswari, J. J., e Unniappan, S. (2022). Kisspeptin stimulates oocyte maturation, and food deprivation modulates the abundance of kisspeptin system in zebrafish gonads. *Aquaculture and Fisheries*.
- Hayashi, C., Meurer, F., Boscolo, W. R., Lacerda, C. H. F., e Kavata, L. C. B. (2004). Frequência de arraçamento para alevinos de lambari do rabo-amarelo (*Astyanax bimaculatus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33, 21-26.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa pecuária municipal. Rio de Janeiro: IBGE, 2018. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf. Acesso em: 20 jul. 2020.
- Konzen-Freitas, A. R., de Abreu, J. G., de Abreu, J. S., de Queiroz Dantas, V. L., Corrêa Filho, R. A. C., & Povh, J. A. (2020). Tambaqui females (*Colossoma*

- macropomum) spawn after hormonal induction with buserelin acetate. *Animal Reproduction Science*, 221, 106594.
- Król, J., Żarski, D., Bernáth, G., Palińska-Żarska, K., Krejszeff, S., Długoński, A., & Horváth, Á. (2018). Effect of urine contamination on semen quality variables in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. *Animal reproduction science*, 197, 240-246.
- KUBITZA, Fernando.(2017). Reprodução, larvicultura e produção de alevinos de peixes nativos. 1. Ed. Jundiaí: Editora Kubitza.
- Leite, Jordana Sampaio, Mayara Setúbal Oliveira-Araújo, Priscila Silva De Almeida-Monteiro, Cláudio Cabral Campello, ANA Cláudia Nascimento Campos, and Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley. "SEASONAL VARIATION IN SEMINAL QUALITY IN BRAZILIAN BOCACHICO (TELEOSTEI, CHARACIFORMES)." *Caatinga* 31.3 (2018): 759-66. Web.
- Lira, L. V. G., Kuradomi, R. Y., Souza, T. G. D., Hainfellner, P., e Batlouni, S. R. (2018). *Astyanax altiparanae* ovarian maturation after spawning in water recycling systems. *B. Inst. Pesca*, e207-e207.
- Merlano, J. R., Robles, V. M., & Cruz-Casallas, P. (2011). Variación estacional de las características seminales del bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, pimelodidae). *Revista MVZ Córdoba*, 16(1).
- Neto, J. D. F. T., & Ribeiro, O. F. (1946). Sobre a técnica de hipofiseação de peixes. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo*, 3(3), 5-14.
- Pires, L. B., Sanches, E. A., Romagosa, E., Corrêa Filho, R. A. C., Streit Junior, D. P., Nass, R. A. R., e Povh, J. A. (2017). Semen characteristics of *Colossoma macropomum* from three successive sample collections in the same reproductive cycle. *Aquaculture Research*, 48(9), 5104-5110.
- Pires, L. B., Corrêa Filho, R. A. C., Sanches, E. A., Romagosa, E., da Silva, T. G., Rech, S., ... e Povh, J. A. (2018). *Colossoma macropomum* females can reproduce more than once in the same reproductive period. *Animal reproduction science*, 196, 138-142.
- Piironen, J. (1985). Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar* m. sebago Girard) during a spawning season. *Aquaculture*, 48(3-4), 337-350.

- Ranzani-Paiva, M.J.T.; de Pádua, S. B., Tavares-Dias, M., e Egami, M. I. (2013). *Métodos para análise hematológica em peixes*. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM.
- Regazzi, A. J., e Silva, C. H. O. (2004). Teste para verificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não-linear. I. dados no delineamento inteiramente casualizado. *Revista de Matemática e Estatística*, 22(3), 33-45.
- Roubach, R., Gomes, L. C., Leão Fonseca, F. A., e Val, A. L. (2005). Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 36(11), 1056-1061.
- Sanches, E. A., Okawara, R. Y., Caneppele, D., Toledo, C. P. R., Bombardelli, R. A., e Romagosa, E. (2015). Sperm characteristics of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) throughout 112 h of storage at four temperatures. *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 79-88.
- Sato, Y., Sampaio, E. V., Fenerich-Verani, N., e Verani, J. R. (2006). Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23, 267-273. <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1590/S0101-81752006000100021>
- Silveira, E. L., e Vaz-dos-Santos, A. M. (2015). Length-weight relationships for 22 neotropical freshwater fishes from a subtropical river basin. *Journal of Applied Ichthyology*, 31(3), 552-554. <https://doiorg.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jai.12699>
- Sokołowska-Mikołajczyk, M., Gosiewski, G., Chyb, J., & Socha, M. (2018). Short-term effects of human kisspeptin on LH secretion in Prussian carp (*Carassius gibelio* Bloch, 1782) females at two gonad maturity stages. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(2), 229-237.
- Sussel, F. R. (2015). Lambari: Pequeno no tamanho, grande no potencial. *Panorama da Aquicultura*, 25, 50– 53.
- Zaniboni Filho, E., e Weingartner, M. (2007). Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31(3), 367-373.
- Zar, J.H., 2010. Biostatistical Analysis. 5 Ed. New Jersey: Prentice-Hall, 944 p.
- Zohar, Y., e Mylonas, C. C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. In *Reproductive biotechnology in Finfish aquaculture* (pp. 99-136). Elsevier.

- Yaron, Z., Levavi-Sivan, B. (2006). Reproduction.. In: Evans, D. H., Claiborne, J. B. The Physiology of Fishes. 3rd ed.. Ed.Taylor e Francis. p. 361.
- Yasui, G.S., Senhorini, J.A., Shimoda, E., Pereira-Santos, M., Nakaghi, L.S.O., Fujimoto, T., Arias-Rodriguez, L., Silva, L.A., 2015. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. *Animal* 9 (3), 464–470. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002511>.