

Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos

Importance of evaluation of reproductive parameters in native fish

L.D. Solis-Murgas¹, V.O. Felizardo, M.R. Ferreira, E.S. Andrade, G.C. Veras

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil.

¹Autor para correspondência: ismurgas@dmv.ufla.br

Resumo

A capacidade reprodutiva dos grandes peixes migradores é dependente de estímulos ambientais que são responsáveis pela síntese e liberação dos hormônios hipofisários, FSH e LH. A partir destes estímulos, estes indivíduos iniciam o processo de desenvolvimento e maturação gonadal, eventos estes que culminam com a desova. Porém, quando em cativeiro, a mimetização do ambiente, capaz de reproduzir os estímulos naturais para reprodutores, ainda é falha, sendo necessária a indução hormonal. A partir do momento em que a indução hormonal é realizada, surge a necessidade de desenvolver novas técnicas para avaliação dos gametas, aumentando a eficiência reprodutiva. Assim, esta revisão tem o objetivo de focar as diferentes técnicas de avaliação dos parâmetros reprodutivos, tanto dos machos quanto das fêmeas, identificando novas metodologias e sustentando a utilização de técnicas já consolidadas.

Palavras-chave: avaliação de reprodutores, peixes teleósteos, reprodução induzida.

Abstract

The reproductive capacity of large migratory fish is dependent of environmental stimuli that are responsible for the synthesis and release of pituitary hormones, FSH and LH. From these stimuli began the process of development and maturation of the gonads, culminating in spawning. But in captivity, the environment is not capable of reproducing the natural stimuli for breeding, requiring hormonal induction. When the hormonal induction is performed, there is a necessity to develop new techniques for evaluating the gametes, increasing the reproductive efficiency. So this review is aimed to focus on different techniques for reproductive assessment, both for male and female, identifying new methods and techniques and support the use of those that are already consolidated.

Keywords: breeder evaluation, induction of reproduction, teleost fish.

Introdução

Peixes migradores não apresentam capacidade de desovar em ambientes lênticos, devido à falta de qualidades ambientais adequadas para a reprodução, como migração, profundidade ou corredoiros (Mylonas et al., 2010). Dessa forma, a manipulação artificial do seu ciclo reprodutivo constitui uma técnica eficiente para a indução da desova e espermição, permitindo que ocorra a reprodução destes indivíduos no momento desejado e em condições controladas de cativeiro.

A baixa eficiência reprodutiva dos animais em cativeiro está relacionada com o não desenvolvimento e maturação gonadal adequados, que são determinados pelas gonadotrofinas, pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e pelo hormônio luteinizante (LH). Estes são hormônios glicoproteicos que estão diretamente envolvidos no processo de produção de gametas pelas gônadas.

Em peixes teleósteos, o hipotálamo e a hipófise são estruturas localizadas na base do diencéfalo e são os principais centros que coordenam os eventos fisiológicos e, particularmente, os neuroendócrinos (Iseki e Negrão, 2003). O hipotálamo processa os estímulos externos e internos percebidos pelos peixes e inicia a cascata hormonal e fisiológica ligada à reprodução por meio da liberação dos hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH) e dopamina, que são de grande importância prática na reprodução induzida em peixes (Mylonas et al., 2010).

O GnRH é responsável pelo estímulo à hipófise para a síntese e a liberação das gonadotrofinas (FSH e LH) enquanto a dopamina a inibe. O FSH é responsável pela liberação de estradiol pelo ovário, pelo crescimento gonadal, pela gametogênese e pela entrada de vitelogenina no ovócito, enquanto o LH é importante para a maturação final dos gametas e sua posterior liberação. Os esteroides sexuais e outros fatores gonadais exercem um controle de *feedback* tanto positivo e quanto negativo no hipotálamo, na hipófise e nas próprias gônadas (Sallum, 1999).

Esta revisão tem como objetivo principal enfatizar as diferentes técnicas de avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos bem como sua importância para o melhor desempenho dos reprodutores.

Período reprodutivo

As particularidades no comportamento reprodutivo das diferentes espécies estão relacionadas com a possibilidade de se aumentar a sobrevivência das larvas. Isto significa que a desova deve ocorrer em um momento no qual há maior disponibilidade de alimentos e de proteção dos jovens contra os predadores. Os maiores períodos de luminosidade estão relacionados com a primavera e o verão, momentos nos quais ocorrem os maiores índices pluviométricos e de temperatura. Entre os peixes migradores de rios tropicais, o início da estação de cheias é o principal período de desova para peixes cujas larvas se alimentam nas planícies de inundação (Zaniboni Filho e Weingartner, 2007).

Estímulos ambientais, determinados pelos ritmos circadianos, convergem para a região pré-óptica do hipotálamo, responsável pela liberação do GnRH e da dopamina. Os neurônios hipotalâmicos penetram a adeno-hipófise, responsável pela síntese e secreção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), os quais controlam o desenvolvimento e a maturação gonadal (Chang et al., 2000). Em peixes migradores de “piracema”, mantidos em cativeiro, os estímulos ambientais não estão presentes, sendo necessária a utilização de técnicas de indução do processo reprodutivo, a partir da aplicação de hormônios.

Hormônios utilizados

A utilização do extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) é o método de indução artificial da reprodução de espécies de caráter reofílico mais utilizado nas estações de piscicultura (Streit Jr et al., 2003). Porém, este extrato é proveniente de espécies *Cyprinus carpio*, as quais geralmente são importadas, possuindo elevado custo e possibilidade de introdução de doenças quando adquiridas de empresas não registradas.

A utilização de hormônios sintéticos, no Brasil, em reprodução artificial de peixes ainda é pequena em relação ao EBHC (Sallum, 2002). Os hormônios sintéticos mais utilizados geralmente são agonistas de GnRH, os quais funcionam como dispositivos contínuos de liberação hormonal para mimetização da liberação dos hormônios gonadotróficos durante o processo reprodutivo (Zohar e Mylonas, 2007).

Os hormônios sintéticos, porém, mimetizam apenas alguns tipos de GnRH, sendo existentes 23 formas moleculares de GnRH identificadas em vários vertebrados e espécies protocordadas (Millar et al., 2004). As formas mais presentes nos peixes incluem o GnRH-II (galinha) e o GnRH (salmão; Klausen et al., 2008). A importância de especificação do tipo de GnRH utilizado para estudo está no tipo de resposta celular estimulada pelo hormônio em questão. Estudos comprovam que diferentes formas moleculares de GnRH podem induzir ativação de diferentes sinalizações moleculares, e consequentemente, causar variação na resposta celular estimulada (Caunt et al., 2006; Klausen et al., 2008).

Importância da avaliação dos reprodutores antes da indução hormonal

Para que ocorra o sucesso da indução hormonal, os reprodutores devem ser selecionados de acordo com as características citadas por Woynarovich e Hóvath (1989). Para as fêmeas, estas características incluem abdômen bem desenvolvido e macio ao toque, papila urogenital proeminente e de coloração rosada ou avermelhada e orifício genital ligeiramente aberto. Para os machos, ocorre a liberação de algumas gotas de sêmen sob leve massagem abdominal.

Estas características, entretanto, são subjetivas, não levando em conta as diversas espécies existentes e nem suas características reprodutivas específicas. Além disso, muitas espécies de teleósteos não apresentam dimorfismo sexual, sendo difícil distinguir os machos e as fêmeas. As características sexuais são importantes, pois elas indicam o estágio de maturação gonadal. Esta indicação propicia o melhor momento de aplicação hormonal, aumentando a eficiência da indução e melhorando os índices reprodutivos do plantel em cativeiro.

Parâmetros reprodutivos em fêmeas

Estudos que envolvem a determinação do desenvolvimento e da maturação sexual são fundamentais para a ciência da pesca e são pré-requisitos para a compreensão do ciclo de vida dos peixes (Sivakumarana et al., 2003). O método mais adequado para a determinação do ciclo reprodutivo em fêmeas é a observação de modificações sazonais no desenvolvimento das gônadas (Karlou Riga e Economidis, 1996).

Várias técnicas vêm sendo empregadas para solucionar problemas que ocorrem em grande parte dos trabalhos com reprodução de peixes. Alguns destes problemas são a ausência de dimorfismo sexual nos peixes teleósteos e a capacidade de determinar a qualidade dos ovócitos bem como as características que determinem sua capacidade de obter sucesso na fertilização (Bromage et al., 1992). Segundo Okuzawa (2002), nos peixes, como em outros vertebrados, os mecanismos intrínsecos à puberdade, especialmente o seu início, não são compreendidos inteiramente. Estes mecanismos provavelmente são diferentes entre as espécies de teleósteos, os quais constituem o maior táxon entre os vertebrados.

Diversos métodos têm sido descritos para determinar o estágio de maturação de desenvolvimento

gonadal em peixes. Em algumas espécies as gônadas podem ser visualizadas com auxílio de endoscópio, entretanto este método, embora eficiente na inspeção de estágios avançados de vitelogênese, apresenta-se problemático em estágios menos avançados nos quais apenas gordura é coletada e repetidas coletas de amostras são necessárias. O otoscópio e os endoscópios já foram utilizados com sucesso para determinar o sexo e a maturidade dos peixes, incluindo o esturjão *Scaphirhynchus platyrhynchus* (Kynard e Kieffer, 2002; Wildhaber et al., 2005) e o esturjão do golfo do México *Acipenser oxyrinchus* (Hernandez-Divers et al., 2004). Pouca pesquisa com espécies nativas de peixes tem sido realizada usando esta metodologia.

Outros métodos, como ultrassom e o uso de cânulas, já foram testados em várias espécies, como piabanha *Brycon insignis* (Andrade-Talmelli et al., 2002) e dourado *Salminus brasiliensis* (Dumont-Neto et al., 1997). A análise da distribuição da frequência percentual dos diâmetros dos ovócitos intraovarianos como indicador do grau de desenvolvimento gonadal das fêmeas foi utilizada pela primeira vez por Fenerich-Verani et al. (1984) com curimatá *Prochilodus scrofa*. Essas autoras observaram que o sucesso da fertilização ocorria somente em fêmeas com ovócitos de diâmetros superiores a 735,55 µm, com distribuição unimodal e simétrica, e que as fêmeas que apresentavam ovócitos maiores, porém com distribuição polimodal, não respondiam aos tratamentos hormonais.

Outra metodologia utilizada como indicador do grau de desenvolvimento gonadal para a seleção de fêmeas aptas à reprodução e da qualidade da desova é a análise da posição do núcleo nos ovócitos. Ovócitos em final de maturação apresentam o núcleo situado na periferia da célula, contrariamente ao que ocorre em ovócitos imaturos ou em maturação, em que a posição do núcleo é central. Alguns trabalhos já foram realizados em diferentes espécies, como o de Narahara et al. (2002), que trabalharam com Pirapitinga-do-Sul *Brycon opalinus*.

Na avaliação da desova, alguns outros parâmetros também podem ser avaliados, dentre estes pode-se citar o índice de desova ($ID = \text{peso da ova} \times 100 / \text{peso corporal da fêmea}$), que indica o rendimento da desova em relação ao peso corporal do indivíduo, o número relativo de ovócitos não hidratados por ml, que é determinado por meio da contagem de três amostras de 0,1 mL de ovócitos; e o índice gonadossomático ($\text{peso da desova} + \text{peso dos ovários esgotados} \times 100 / \text{peso corporal}$), que expressa a porcentagem que as gônadas representam do peso total dos indivíduos, variando principalmente em função da espécie, do tipo de desova, da época do ano e das condições ambientais e de manejo.

Análise seminal

Por meio de várias pesquisas realizadas ao longo dos anos, o conhecimento da fisiologia da reprodução associado aos estudos de biologia de peixes permitiu a determinação de procedimentos de manejo que permitem a maturação gonadal dos peixes em cativeiro, bem como a indução dos processos de maturação final dos gametas e a subsequente fertilização (Zaniboni Filho e Weingartner, 2007).

As características seminais são muito variadas entre as espécies de peixes, e a sua avaliação é de grande importância para o estabelecimento da fertilização artificial. Para a descrição de um perfil espermático, são analisadas as características físicas do sêmen (volume, motilidade, vigor e concentração) e as características morfológicas dos espermatozoides (Routray et al., 2007). É necessário o conhecimento desses valores para que se possa avaliar a qualidade do sêmen coletado e, com isso, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (Viveiros, 2005).

A avaliação das características seminais é imprescindível na rotina de reprodução artificial em qualquer espécie. Para descrição de um perfil espermático, são analisadas as características físicas do sêmen (volume, taxa e duração da motilidade espermática, concentração e morfologia). Estes parâmetros devem fazer parte da rotina de pisciculturas que realizam a indução hormonal e têm sido determinados em algumas espécies reofilicas.

Volume de sêmen

Na maioria das espécies de peixes que recebem o tratamento hormonal, é observado um aumento significativo no volume seminal. Porém, o volume não tem um valor intrínseco biológico, e sim pela quantidade de células fecundantes que possa conter. O volume é muito variável entre as diversas espécies e até mesmo na mesma espécie, por ser influenciado pela estação do ano, clima, período de repouso sexual e método de coleta. Algumas espécies, como o *Brycon orbignyanus*, podem liberar um volume relativamente grande de sêmen (>10 ml), quando comparadas ao *L. macrocephalus* e ao *Z. jahu*, cujo sêmen tem sido quase impossível de obter, sendo necessário realizar a extração dos testículos para coleta intratesticular (Viveiros e Godinho, 2008). Em *P. lineatus*, Silva et al. (2009), avaliando a época de coleta de sêmen, verificaram que esta variável não influenciou significativamente o volume seminal obtido dessa espécie. No entanto, os autores verificaram um aumento na concentração espermática ao final do período reprodutivo.

Concentração espermática

A concentração ou densidade espermática expressa a quantidade de espermatozoides por ml de sêmen,

podendo ser determinada pela contagem em câmaras volumétricas, mediante diluição do sêmen em formolcitrato (Felizardo et al., 2010 a). Valores de concentração podem variar de acordo com peso e idade do peixe, época do ano (Silva et al., 2009), frequência de coleta e volume do ejaculado.

O número de espermatozóide ml^{-1} é altamente variável entre as espécies brasileiras. É verificado um aumento na concentração espermática de peixes induzidos hormonalmente quando comparados àqueles que não receberam a indução (Viveiros e Godinho, 2008). A concentração espermática pode variar de $7,3 \times 10^9$ em *B. orbignyana* (Felizardo et al., 2010b) a 125×10^9 espermatozoides ml^{-1} em *R. quelen* (Borges et al., 2005).

Geralmente uma baixa concentração espermática é seguida por um aumento no volume seminal em peixes induzidos hormonalmente, porém este fato não foi observado em espécies como o *B. orbignyana*, *P. mesopotamicus* e o *P. brachypomus* (Viveiros e Godinho, 2008).

Taxa e duração da motilidade espermática

A motilidade espermática é um dos principais parâmetros a serem considerados na análise da qualidade do sêmen de peixes. Para tanto, deve-se levar em conta que a motilidade espermática é influenciada por inúmeros fatores, como temperatura, estado nutricional, estado sanitário, condições de análise, soluções ativadoras empregadas e espécie estudada.

A osmolaridade isotônica ao plasma seminal suprime a motilidade espermática em teleósteos marinhos e de água doce. Quando o sêmen é exposto à hipertonicidade da água salgada ou hipotonicidade da água doce, respectivamente, induz à iniciação da motilidade espermática (Takai e Morisawa, 1995).

A diminuição da capacidade de movimentos dos espermatozoides é originada, em parte, pela diminuição do estoque de energia ocorrida durante o período de motilidade. A duração da motilidade espermática em peixes de água doce é muito curta e muito variada entre as espécies: 30-40 segundos a 20°C em carpa (Billard et al., 1995) e 486 segundos a 26°C em pacu (*Piaractus mesopotamicus*; Maria et al., 2004).

Morfologia espermática

Segundo Nagahama (1983), os espermatozoides de peixes podem ser morfológicamente divididos em cabeça, peça intermediária e cauda. Na maioria dos grupos de peixes, falta o acrossoma, que ocorre em todos os outros grupos de vertebrados. Todavia, a carência do acrossoma é compensada pela presença da micrúpila no ovócito, que facilita a entrada do espermatozoide (Cosson et al., 1999).

Alterações morfológicas nos espermatozoides podem ocorrer após o aumento ou a diminuição da osmolaridade do meio que os circunda. Segundo Herman et al. (1994), as alterações primárias (flagelo dobrado, cabeça isolada, gotas citoplasmáticas proximal e distal) ocorrem durante a espermatogênese, em decorrência de causas que acometem os reprodutores, tais como enfermidades, consanguinidade, restrição alimentar e estresse ambiental. Por outro lado, as alterações secundárias (flagelo quebrado, enrolado, degenerado, macrocefalia, microcefalia) estariam relacionadas aos procedimentos de manejo durante a coleta do sêmen.

A avaliação morfológica dos espermatozoides de peixes pode auxiliar na caracterização de amostras seminais, fazendo inferência sobre seu potencial fertilizante ou de amostras congeladas de sêmen e explicando insucessos de reprodutores tidos como aptos após análises convencionais de motilidade espermática (Miliorini, 2006).

Referências bibliográficas

- Andrade-Talmelli EF, Kavamoto ET, Narahara MY, Fenerichverani N.** Reprodução Induzida da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876) Characiformes, Bryconinae), mantida em confinamento. *Rev Bras Zootec*, v.31, supl., p. 803-811, 2002.
- Billard R, Cosson J, Percec J, Linhart O.** Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, v.129, p.95-112, 1995.
- Borges A, Siqueira DR, Jurinitz DF, Zanini R, Amaral F, Grillo ML.** Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiol Biochem*, v.31, p.45-53, 2005.
- Bromage N, Jones J, Randall C, Thursh M, Springate J, Barker G.** Broodstock management, fecundity, egg quality and timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v.100, p.66-141, 1992.
- Caunt CJ, Finch AR, Sedgley KR, Oakley L, Luttrell LM, Mcardle CA.** Arrestin-mediated ERK activation by gonadotropin-releasing hormone receptors: receptor-specific activation mechanisms and compartmentalization. *J Biol Chem*, v.281, p.2701-2710, 2006.
- Chang JP, Johnson JD, Van Goor F, Wong CJ, Yunker WK, Uretsky AD, Taylor D, Jobin RM, Wong AO, Goldberg JI.** Signal transduction mechanisms mediating secretion in goldfish gonadotropes and somatotropes. *Biochem Cell Biol*, v.78, p.139-153, 2000.

- Cosson J, Billard R, Cibert C, Dréanno C, Suquet M.** Ionic factors controlling the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.). *The male gamete: from basic science to clinical applications*. Viena: Cache River, 1999. p.162-186.
- Dumont-Neto E, Pelli A, Freitas RO, Costa CL, Barbosa NDC.** Reprodução induzida do dourado (*Salminus maxillosus*, Valenciennes, 1849) na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Volta-Grande CEMIG/EPDA/V.G. *Rev Unimar*, v.19, p.439-445, 1997.
- Felizardo VO, Mello RA, Murgas LDS, Andrade ES, Drumond MM, Rosa PV.** Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Anim Reprod Sci*, v.122, p.259-263, 2010a.
- Felizardo VO, Murgas LDS, Drumond MM, Silva JA.** Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócitos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *Rev Ceres*, v.57, p.648-652, 2010b.
- Fenerich-Verani N, Godinho HM, Narahara MY.** The size composition of the eggs of curimbata, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, induced to spawn with human chorionic gonadotropin (HCG). *Aquaculture*, v.42, p.37-41, 1984
- Herman HA, Mitchell JR, Doak GA.** *The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle*. Danville, IL: Interstate, 1994. 392p.
- Hernandez-Divers SJ, Bakal RS, Hickson BH, Rawlings CA, Wilson HG, Radlinsky M, Hernandez-Divers SM, Dover SR.** Endoscopic sex determinations and gonadal manipulation in gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi*). *J Zool*, v.35, p.459-470, 2004.
- Iseki KK, Negrão JA.** Controle neuroendócrino da reprodução de peixes teleósteos. *Rev Ciênc Vet*, v.1, p.11-22, 2003.
- Karlou-Riga C, Economidis PS.** Ovarian atretic rates and sexual maturity of horse mackerel, *Trachurus trachurus* (L.), in the Saronikos Gulf (Greece). *Fish Bull*, v. 4, p. 6-76, 1996
- Klausen C, Booth M, Habibi HR, Chang JP.** Extracellular signal-regulated kinase mediates gonadotropin subunit gene expression and LH release responses to endogenous gonadotropin-releasing hormones in goldfish. *Gen Comp Endocrinol*, v.158, p.36-46, 2008.
- Kynard B, Kieffer M.** Use of borescope to determine the sex and egg maturity stage of sturgeons and the effect of borescope use on reproductive structures. *J Appl Ichthyol*, v.18, p.505-508, 2002.
- Maria AN, Murgas LDS, Silva MOB, Miliorini AB, Franciscatto RT, Logato PVR.** Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887). *Cienc Agrotec*, v.28, p.191-194, 2004.
- Miliorini AB.** *Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (Prochilodus lineatus)*. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, MG, 2006.
- Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR.** Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev*, v.25, p.235-275, 2004.
- Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S.** Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen Comp Endocrinol*, v.165, p.516-534, 2010.
- Nagahama Y.** The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Ed.). *Fish physiology*. New York: Academic, 1983. v.9, p.233-275.
- Narahara MY, Andrade-Talmelli EF, Kavamoto ET, Godinho HN.** Reprodução induzida da Pirapitinga-do-Sul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), mantida em condições de confinamento. *Rev Bras Zootec*, v.31, p.1070-1075, 2002.
- Okuzawa K.** Puberty in teleosts. *Fish Physiol Biochem*, v.26, p.31-41, 2002.
- Routray P, Verma, DK, Sarkar SK, Sarangi N.** Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. *Fish Physiol Biochem*, v.33, p.413-427, 2007.
- Sallum WB.** *Reprodução artificial das principais espécies de peixes de caráter reofílico*. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 56p. (Curso de Especialização em Piscicultura).
- Sallum WB.** *Reprodução das principais espécies de peixes*. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 47p. (Curso de Especialização em Piscicultura).
- Silva JMA, Murgas LDS, Felizardo VO, Pereira GJM, Navarro RD, Mello RA.** Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, v.10, p.668-677, 2009.
- Sivakumarana KP, Brown P, Stoessel D, Giles A.** Maturation and reproductive biology of female wild carp, *Cyprinus carpio*, in Victoria, Australia. *Environ Biol Fishes*, v.68, p.321-332, 2003.
- Streit-Jr DP, Moraes GV, Ribeiro RP, Caçador WC, Sakaguti ES, Povh JA, Souza ED.** Estudo comparativo da indução hormonal da espermiacção em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. *Acta Sci Anim Sci*, v.25, p.261-266, 2003.
- Takai H, Morisawa M.** Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. *J Cell Sci*, v.108, p.1175-1181, 1995.
- Viveiros ATM.** Criopreservação de sêmen de peixes. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. *Anais...* Belo Horizonte, MG: CBRA, 2005. CD-ROM.



Viveiros ATM, Godinho HP. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem*, v.35, p.137-150, 2008.

Wildhaber ML, Papoulias DM, Delonay AJ, Tillitt DE, Bryan JL, Annis ML, Aller JA. Gender identification of shovelnose sturgeon using ultrasonic and endoscopic imagery and the application of the method to the pallid sturgeon. *J Fish Biol*, v.67, p.114-132, 2005.

Woyanovich E, Horváth L. *Propagação artificial de peixes de águas tropicais*: manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPQ, 1989. 225p.

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

Zohar Y, Mylonas CC. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, v.197, p.99-136, 2007.
