

CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS DO SÊMEN DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*) APÓS INDUÇÃO HORMONAL

THE SEMEN QUALITATIVE CHARACTERISTICS AND SPERMATOZOA LIFE TIME OFO PACU (*Piaractus mesopotamicus*) AFTER HORMONAL INDUCTION

Danilo Pedro STREIT JR.¹; Ricardo Pereira RIBEIRO², Gentil Vanini de MORAES², Lauro Vargas MENDEZ²; Juliana Minardi GALLO³, Melanie DIGMAYER³; Jayme Aparecido POVH⁴

RESUMO: Parâmetros qualitativos do sêmen de 44 *Piaractus mesopotamicus* foram analisados com e sem a indução reprodutiva com extrato de hipófise de carpa. Não ocorreu diferença ($P > 0,05$) para a motilidade progressiva e vigor espermático entre os tratamentos, muito embora tenha ocorrido uma tendência de médias maior para o sêmen oriundo de animais induzidos, 79,5 % e 3,7 pontos contra 73,5 % e 3,5 pontos respectivamente. O tempo de vida dos espermatozoides também não apresentou diferença ($P > 0,05$) para o sêmen analisado com e sem indução hormonal 50,3 e 52,4 segundos, respectivamente. Não houve diferença ($P > 0,05$) no sêmen analisado de pacus induzidos e não induzidos, para porcentagem de espermatozoides normais (58,2 e 62,6) com patologias leves (12,9 e 12,1) e graves (28,9 e 25,3). Os tipos de patologias mais incidentes, tanto no sêmen de animais induzidos e não induzidos, foram cauda quebrada e enrolada, sendo os dois tipos graves. Através dos resultados conclui-se que a indução hormonal com extrato de hipófise de carpa, não causou alterações significativas para os parâmetros qualitativos avaliados. Porém, ficou constatado a incidência elevada de patologias graves no sêmen de pacu, especialmente, cauda enrolada, quebrada e corrugada.

PALAVRAS-CHAVE: Espermatozoides. Indução hormonal. Peixe. Patologia espermática. Sêmen.

INTRODUÇÃO

A disponibilidade de espermatozoides de boa qualidade e em quantidade suficiente, no momento certo, pode determinar o sucesso da reprodução artificial (BILLARD et al., 1995; RURANGWA et al., 2004).

Dentre os fatores bióticos e abióticos que afetam a qualidade do sêmen de peixes, Rurangwa et al. (2004) mencionaram que a indução hormonal para a liberação de sêmen pode comprometer a qualidade dos gametas. Entretanto, inúmeras espécies de grande valor econômico necessitam de indução hormonal, pois não são capazes de liberar, espontaneamente, gametas (DONALDSON; HUNTER, 1983). A praticidade e a simplicidade do uso de extrato de hipófise como indutor gonadal de peixes são algumas das vantagens destacadas por Donaldson e Hunter (1983).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*), por ser uma espécie migradora, quando em cativeiro necessita de intervenção hormonal a fim de liberar gametas (CASTAGNOLLI; DONALDSON, 1981). Alguns parâmetros quali-quantitativos do sêmen de pacu obtidos após indução com: extrato de hipófise de carpa (GODINHO; GODINHO, 1986; ZANIBONI FILHO, 1995); gonadotrofina coriônica humana (hCG) (GODINHO et al., 1977; SILVEIRA et al., 1990) e hormônio liberador do hormônio luteinizante (LhRH) (ZANIBONI FILHO, 1995) já foram avaliados.

A qualidade do sêmen pode ser determinada pela avaliação de parâmetros como a motilidade espermática progressiva, o vigor espermático, pH, a concentração de espermatozoides e morfologia espermática. Dentre os parâmetros avaliados, a motilidade espermática é um fator preponderante para qualidade do sêmen (BILLARD et

¹ Doutor em Zootecnia. Pesquisador na Universidade Estadual de Maringá. Bolsista Recém Doutor Júnior do CNPq.

² Professor Doutor do Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Maringá.

³ Graduandas do curso de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá. Bolsistas PIBIC do CNPq.

⁴ Doutorando em Zootecnia do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá.

Received: 21/12/05 Accept: 18/05/06

al., 1995; COSSON et al., 1999; RURANGAWA et al., 2004). O vigor espermático, que se caracteriza pela velocidade com que os espermatozoides se movimentam, é outro parâmetro essencial para avaliação dos espermatozoides de peixes Cosson et al. (1999) e Vermeirssen et al. (2003). Já o tempo de vida dos espermatozoides, para Stoss (1983) e Cosson et al. (1999), apresenta variação entre as espécies de peixes e coincide, geralmente, com o período de fertilização dos ovócitos, estando diretamente relacionado com o tempo de intensidade da motilidade. As anormalidades morfológicas das células espermáticas são responsáveis pela diminuição na motilidade espermática, provocando a redução na fertilização (COSSON et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros qualitativos do sêmen de pacu (*P. mesopotamicus*), após a indução hormonal com extrato de hipófise de carpa, em relação ao sêmen obtido de animais que não sofreram indução hormonal.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá/Cooperativa de Desenvolvimento do Paraná (UEM/CODAPAR) e o Laboratório de Reprodução Animal da UEM.

Selecionou-se 44 machos de *P. mesopotamicus*, com características reprodutivas requeridas para indução hormonal, como a liberação de sêmen, ao ser comprimido o abdômen do animal no sentido antero-posterior. Após a captura dos animais que estavam estocados em um tanque a uma densidade de um animal/m² eles foram marcados na nadadeira dorsal (HARVEY; CAROLSFELD, 1993) com um fio colorido para monitoramento dos tratamentos. Os machos foram colocados nos tanques de manipulação de 2000 L de maneira aleatória, sendo colocados dois animais por tanque para receberem ou não o tratamento hormonal.

Para a preparação da solução de extrato hormonal, macerou-se hipófise de carpa com uma gota de glicerina e adicionou-se solução salina à 0,7 % na proporção de 1:4 (hipófise: solução salina). Aplicou-se uma única dose intraperitoneal de 2,5 mg de extrato de hipófise de carpa/kg de peixe, utilizando-se seringas plásticas de 10 mL, com agulhas de 25X8, sendo aplicada na base da nadadeira peitoral.

Para a colheita do sêmen dos *P. mesopotamicus*, induzidos e não induzidos com hormônios, estabeleceu-se 240 unidades térmicas acumuladas (UTA). Este valor de 240 UTA baseou-se na recomendação de Ceccarelli,

Senhorini e Volpato (2000) para extrusão de fêmeas de *P. mesopotamicus*, momento este em que é colhido o sêmen para fertilização dos óvulos, além de ser essa a UTA frequentemente utilizada em nosso laboratório. A colheita do sêmen de todos os animais seguiu as recomendações de Billard et al. (1995), em que colocou-se a seringa de 10 mL junto ao orifício urogenital. Quando houve suspeita de contaminação com água, urina ou fezes, descartou-se o sêmen.

Os parâmetros da análise qualitativa do sêmen do *P. mesopotamicus* foram motilidade progressiva, vigor espermático e o tempo de vida dos espermatozoides utilizando-se um microscópio ótico com objetiva de 40. Os procedimentos adotados para análise dos parâmetros qualitativos são descritos a seguir:

Motilidade progressiva e vigor espermático: uma gota do sêmen coletado foi diluída em oito gotas de água destilada em uma lâmina. Em seguida, colocou-se uma gota desta diluição sobre outra lâmina de microscopia ótica e cobriu-se com uma lamínula levando-se ao microscópio pré-ajustado. Ao analisar a lâmina foram atribuídos valores de 0 a 100 % para a motilidade progressiva e de 0 a 5 pontos para o vigor espermático, em função da movimentação dos espermatozoides. Os valores de motilidade progressiva e de vigor espermático foram estabelecidos de acordo com os critérios de Sorensen Júnior (1979), adaptados para análise de sêmen de peixes.

Tempo de vida do espermatozoides: ao colocar a gota de sêmen nas oito gotas de água destilada, um cronômetro foi acionado. Marcou-se o tempo decorrido até que o último espermatozoide parou de mover-se no campo ótico observado na lâmina.

Morfologia: para esta análise produziu-se um esfregaço com o sêmen diluído em formol-salina tamponada, na proporção de 1:2000 (sêmen/solução diluente, respectivamente) para cada animal. Os esfregaços foram corados pelo método de Rosa Bengala (CONN, 1920) e depois de secos, levados ao microscópio para contagem de 100 a 130 espermatozoides, classificando-os em patologias leves e graves.

As patologias leves analisadas compreenderam: cauda dobrada e solta; cabeça solta; gota citoplasmática proximal e distal. Já as patologias graves foram cauda quebrada, enrolada, degenerada, abaxial e bifurcada; cabeça degenerada, microcefalia e macrocefalia.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, no qual avaliou-se o sêmen do pacu com ou sem indução hormonal. Cada amostra de sêmen analisada foi considerada uma unidade experimental.

O modelo proposto foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} = observação do animal (j) que recebeu o tratamento (i);

μ = constante geral;

T_i = tratamento (i);

e_{ij} = erro aleatório associado ao animal (j) que recebeu o tratamento (i).

As variáveis motilidade progressiva, vigor espermático, tempo de vida dos espermatozoides, espermatozoide normal, patologia leve e grave foram comparadas por meio do teste de Tukey, com 5% de significância. As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Statistical Analysis Support, SAS (1992).

RESULTADOS

Não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre as médias dos parâmetros qualitativos avaliados. Entretanto, os animais que foram induzidos à espermição com extrato de hipófise de carpa apresentaram tendência à motilidade progressiva e vigor espermático mais elevados, respectivamente, em relação aos animais não tratados com hormônio (Tabela 1). Com relação ao tempo de vida médio dos espermatozoides dos animais com e sem indução hormonal com extrato de hipófise, também apresentaram resultados médios semelhantes ($P > 0,05$), sendo no entanto mais elevado para os não-induzidos (Tabela 1).

Tabela 1. Média e coeficiente de variação da motilidade progressiva, vigor espermático e tempo de vida dos espermatozoides de *Piaractus mesopotamicus* induzidos ou não com extrato de hipófise de carpa.

PARÂMETROS	TRATAMENTO		CV ¹
	Indução	Sem indução	
Motilidade progressiva (%)	79,5 (22)	73,1 (17)	9,9
Vigor espermático (pontos)	3,7 (22)	3,5 (17)	14,5
Tempo de vida (segundos)	50,3 (22)	52,4 (17)	17,8

¹ Coeficiente de variação; valor entre parênteses, representa o número de observações.

O número de espermatozoides normais não apresentou diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos, em que as médias foram de 58,2 % (induzidos) e de 62,6 % (não-induzidos) (Figura 1). Muito embora o percentual médio de espermatozoides anormais não tenha variado

($P > 0,05$) entre os tratamentos, notou-se que os animais induzidos produziram em média 6% a mais de espermatozoides com patologias secundárias e 14% a mais de patologias primárias (Figura 1).

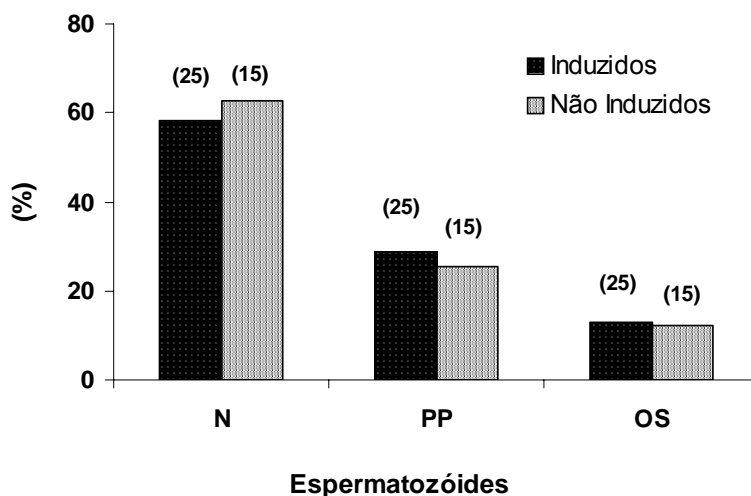


Figura 1. Porcentagem média de espermatozoides normais (N), com patologias primárias (PP) e patologias secundárias (PS), oriundos de *P. mesopotamicus* induzidos e não-induzidos com extrato de hipófise de carpa. Valor entre parênteses representa o número de amostras analisadas.

Dentre as anormalidades verificadas no sêmen de *P. mesopotamicus*, as de maior incidência foram espermatozoides com cauda quebrada e enrolada, sendo as médias absolutas mais elevadas nos animais não-

induzidos. Por outro lado, o edema de colo, cabeça degenerada, microcefalia e macrocefalia foram de incidência baixa (Figura 2).

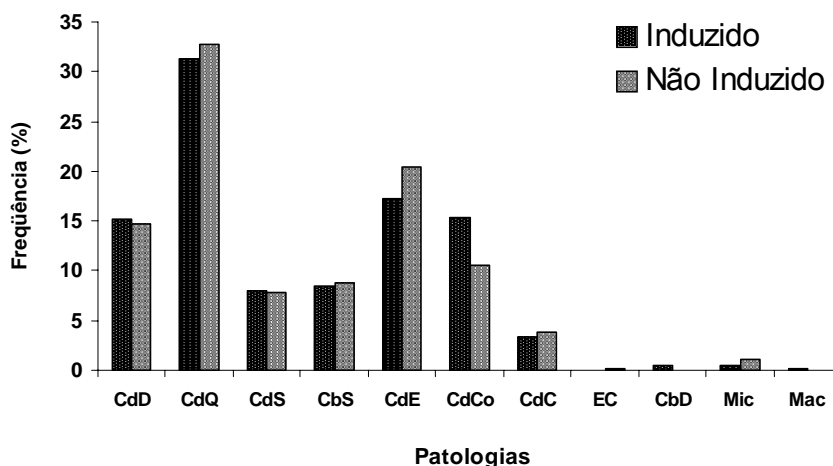


Figura 2. Frequência (%) de patologia verificada em espermatozoides de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) induzidos e não-induzidos com extrato de hipófise de carpa. As anormalidades são: cauda dobrada (CdD), cauda quebrada (CdQ), cauda solta (CdS), cabeça solta (CbS), cauda enrolada (CdE), cauda corrugada (CdCo) e cauda curta (CdC), edema de colo (EC), cabeça de degenerada (CbD), microcefalia (Mic) e macrocefalia (Mac).

DISCUSSÃO

A qualidade do sêmen é altamente variável e depende de inúmeros fatores, como o regime alimentar, a qualidade do alimento, o ambiente do confinamento, entre outros, além do hormônio utilizado para indução hormonal (BILLARD et al., 1995; COSSON et al., 1999).

A motilidade progressiva obtida no sêmen de animais induzidos com extrato de hipófise de carpa foi semelhante aos 76,8 % encontrado por Streit Junior et al. (2005) estudando a mesma espécie e o mesmo hormônio. Por outro lado, foi menor que os 90% registrados por Silveira et al. (1990), que induziram o *P. mesopotamicus* com gonadotrofina coriônica humana (hCG). Apesar de não haver um valor mínimo estabelecido para a motilidade progressiva de sêmen de peixe que garanta sua eficiência, como já é conhecido para sêmen de mamíferos (30 %, em média) (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, CBRA, 1998), pode-se supor que o valor encontrado neste trabalho, não seria comprometedora. A média do vigor espermático verificada neste trabalho, tanto para o sêmen proveniente de animais induzidos como os sem indução pode ser considerado bom, pois com um vigor espermático de 2,7 pontos, Streit Junior et al. (2005) obteve 57,2 % de fertilização dos ovócitos. Os parâmetros de qualidade do sêmen, para Shangguan e Crim (1999) podem sofrer alterações quando

os peixes são induzidos com hormônios, devido a sua ação indireta no ducto espermático. Neste estudo, porém, parece não ter ocorrido ação negativa do extrato de hipófise de carpa para as duas diferentes origens do sêmen.

Foi considerado tempo de vida o período em que o espermatozoide apresentou movimento flagelar (COSSON et al., 1999). A redução do tempo da movimentação flagelar pode representar insucesso na efetiva penetração do espermatozoide na micrópila. Como não ocorreu diferença após a indução hormonal, pode-se atribuir que não houve perda de qualidade do sêmen para este parâmetro. Pode corroborar para este fato a afirmação de Cosson et al. (1999) de que, para a maioria das espécies de peixes de água doce, após a diluição do sêmen, ocorre movimentação máxima dos espermatozoides, porém morrem em menos de um minuto.

A porcentagem de espermatozoides normais, mesmo apresentando média absoluta menor no sêmen de *P. mesopotamicus* induzidos com hormônio, presume-se não ter causado perda de qualidade aos animais que não foram induzidos. Todavia, do total de anormalidades (primárias e secundárias) de 41,8 % para os animais induzidos e de 37,4 % para os que não sofreram indução, não se pode inferir medidas de aceitáveis ou não para sêmen de peixes, por não haver parâmetros estabelecidos. Chama atenção o fato de parecer comum os animais

induzidos e os não-induzidos apresentarem elevado índice de anormalidades primárias (28,91% e 25,33%, respectivamente), que é mais que o dobro em relação as anormalidades secundárias (12,85% e 12,05%, respectivamente). Em mamíferos, as patologias secundárias (menos comprometedoras) em média são sempre mais elevadas que as primárias. Estes resultados contrastam com os valores médio de 12,4% de anormalidades primárias observadas por Streit Junior et al. (2005) ao trabalharem com *P. mesopotamicus*, também induzido com extrato de hipófise.

Em média, as anormalidades primárias para outras espécies brasileiras como *Prochilodus lineatus* (KAWAMOTO et al., 1999); *Leporinus macrocephalus* (STREIT JUNIOR et al., 2003), apresentaram índices menores que 15%. Já Murgas et al. (1999) encontraram 7,06%, em média, de alterações totais (cabeça, peça intermediária e cauda) para *L. obtusidens*, mas não especificaram quais os tipos de patologias e nem a classificação em primárias ou secundárias. Nos mamíferos, as anormalidades primárias originam-se dentre outros fatores, da idade avançada, de doenças infecciosas ou genéticas, da consangüinidade e do estresse dos reprodutores (BART; OKO, 1989). Por outro lado, o principal prejuízo causado pelas anormalidades

dos espermatozoides de peixes é a diminuição da motilidade e, por consequência, a redução da taxa de fertilização (COSSON et al., 1999).

No sêmen de curimatá (*Prochilodus scrofa*) induzidos com hCG (Gonadotrofina Coriônica humana), Kawamoto et al. (1999) constataram maior incidência de espermatozoides com cauda dobrada, enrolada e ausência de cauda. O surgimento de anormalidades primárias, em espermatozoides de outras espécies animais, pode estar relacionado com a deficiência nutricional, idade dos machos, consangüinidade, além de doenças que possam acometer os reprodutores (HERMAN; MITCHELL; DOAK, 1994).

CONCLUSÃO

A partir dos resultados, conclui-se que a indução hormonal com extrato de hipófise de carpa não causou alterações significativas para os parâmetros qualitativos, motilidade progressiva, vigor espermático, tempo de vida, porcentagem de espermatozoides normais e para anormalidades leves e graves no sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Porém, ficou constatada a incidência elevada de patologias graves no sêmen de pacu, especialmente, cauda enrolada, quebrada e corrugada.

ABSTRACT: Qualitative parameters of 44 *Piaractus mesopotamicus* semen were analyzed with and without reproductive induction using hypophysis extract obtained from carp. There was no difference ($P>0.05$) in what concerns both the progressive motility and the spermatic vigor between the treatments, although there was a tendency of greater medians for the semen of induced animals, 79.5% and 3.7 points against 73.5% and 3.5 points, respectively. The spermatozoa's life time did not show any difference as well ($P>0.05$) for the semen analyzed with and without hormonal induction during 50.3 and 52.3 seconds, respectively. There was no difference ($P>0.05$) in the analyzed semen of either the induced or not induced *pacu* fish, considering the percentage of normal spermatozoa (58.2 and 62.6) with secondary pathologies (12.9 and 12.1) and with primary pathologies (28.9 and 25.3). The most incident primary types of pathologies in the semen of both the induced and not induced animals were broken and coiled tail. Based on the results it can be concluded that the hormonal induction with hypophysis extract obtained from carp did not cause any significant changes for the qualitative parameters evaluated. However, a high incidence of primary pathologies was observed in the pacu's semen, mainly crooked, bent and coiled tail.

KEYWORDS: Spermatozoa. Hormonal induction. Fish. Pathologic spermatic. Semen.

REFERÊNCIAS

- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University, 1989. 285 p.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W.; SUQUET, M. Broodstock management and seed quality-General considerations. In: BROMAGE, N.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p. 1-24.

CASTAGNOLLI, N.; DONALDSON, M. E. Induced ovulation and rearing of the pacu (*Colossoma mitrei*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 275-279, Mar./Apr. 1981.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. Belo Horizonte, 1998. 49 p.

CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A.; VOLPATO, G. P. **Dicas em piscicultura: perguntas e respostas**. Botucatu: Santana Gráfica, 2000. 247 p.

CONN, H. J. Rose Bengal as a general bacterial stain. **New York Agricultural Experiment Station**, New York, v. 68, n. 1, p. 253-254, Jul./Dec. 1920.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DREANNO, C.; SUQUET, M. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In: GAGNON, C. In: **The male gamete: from basic knowledge to clinical applications**. Paris: Cache River, 1999. p. 161-186.

DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. A. Induced final maturation, ovulation, and spermiation. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. **Fish physiology**. Orlando: Academic, 1983. p. 352-403.

GODINHO, H. P.; FENERICH, N. A.; NARAHARA, M. Y.; BARKER, J. M. B. Sobre a reprodução induzida de pacu, *Colossoma mitrei* (Berg, 1985). **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 796-797, jan./jun. 1977. (Fascículo complementar).

GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. Induced spawning of the pacu *Colossoma mitrei* (Berg 1895), by hypophysation with crude carp pituitary extract. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 69-73, Jan./Feb. 1986.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: IDRC, 1993. 144 p.

HERMAN, H. A.; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle**. Illinois: Interstate, 1994. 392 p.

KAVAMOTO, E. T.; BARNABE, V. H.; CAMPOS, B. E. S.; TALMELLI, E. F. A. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 61-66, jan./jun. 1999.

MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B.; MELLO, C. B. M.; KABEYA, C. B. M.; SANTANA, G. M. Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 246-248, mai./jun. 1999.

RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1, p. 1-28, Jan./Feb. 2004.

STATISTICAL ANALYSIS SUPPORT INSTITUTE INC. **SAS technical report**. Release 6.07. Cary: NC, 1992. 229 p.

SHANGGUAN, B.; CRIM, L. W. Seasonal variation in sperm production and sperm quality in male winter flounder, *Pleuronectes americanus*: the effects of hypophysectomy, pituitary replacement therapy, and GnRH-A treatment. **Marine Biology**, London, v. 34, n. 1, p. 19-27, Jan./Feb. 1999.

SILVEIRA, W. F.; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. M.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus*

(Holmberg), proveniente de reprodução induzida. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 1-13, jan./jun. 1990.

SORENSEN JUNIOR., A. M. **A laboratory for animal reproduction**. Massachusetts: American, 1979. 153 p.

STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. **Fish physiology**. Orlando: Academic, 1983, p. 305-350.

STREIT JUNIOR, D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; SAKAGUTY, E. S.; POVH, J. A.; MOREIRA, H. L. M. Effects of three different sources of pituitary extract on gonadal inducer in male and female pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 27, n.4, p. 439-447, out./dez. 2005.

STREIT JUNIOR., D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; CAÇADOR, W. C.; SAKAGUTI, E. S.; POVH, J. A.; SOUZA, E. D. Estudos comparativo da indução hormonal da espermiacão em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 261-266, Abr./Jun. 2003.

VERMEIRSEN, E. L. M.; QUERO, C. M.; SHIELDS, R. J.; NORBERG, B.; KIME, D. E.; SCOTT, A. P. Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotrophin-releasing hormone agonist implant. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 230, n. 3, p. 547-567, May./Jun. 2003.

ZANIBONI FILHO, E. Utilização do LHRH-a para indução à espermiacão e desova do pacu-caranha *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Biotemas**, Florianópolis, v. 8, n. 1, p. 36-45, jan./jun. 1995.