

EFEITO DE APLICAÇÃO DO HORMÔNIO HCG EM MACHOS DE DIFERENTES VARIEDADES DE TILÁPIA DO NILO *OREOCHROMIS NILOTICUS*¹

U. N. SOUZA², V. O. FELIZARDO³, C. C. V. MELO^{*4}, R. V. REIS NETO⁵, M. R. F. MACHADO⁶, R. T. F. FREITAS³

¹Recebido em 07/02/2017. Aprovado em 23/03/2018.

²Instituto Federal do Mato Grosso, São Vicente da Serra, MT, Brasil.

³Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

⁴Instituto Federal Baiano, Santa Inês, BA, Brasil.

⁵Universidade Estadual Paulista, Registro, SP, Brasil.

⁶Universidade Federal de Goiás, Jataí, GO, Brasil.

*Autor correspondente: carloscicinato85@gmail.com

RESUMO: Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do horário de aplicação da gonadotrofina coriônica humana (hCG), sobre os parâmetros reprodutivos de 40 machos das variedades de tilápias do Nilo GIFT e UFLA. O experimento foi conduzido no Laboratório de Recirculação de Água da Estação de Piscicultura, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras - MG. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 (duas variedades e quatro horários de aplicação do hCG) com cinco repetições. Foram utilizados 20 machos da variedade GIFT e 20 machos da variedade UFLA, microchipados e alojados em um sistema de recirculação de água. Os horários foram 6, 12, 18 e 24 horas. A dosagem de hCG foi realizada em dose única. Foram analisadas as variáveis: taxa e duração da motilidade espermática, morfologia espermática, volume de sêmen e a concentração de espermatozoides do sêmen. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e as médias foram comparadas pelo teste SNK a 5% de significância. O horário de aplicação e a variedade utilizada não influenciaram as variáveis analisadas, porém a variedade UFLA apresentou um maior número de animais que espermiaram. A concentração apresentou uma média de $5,73 \times 10^5$ espermatozoide/mL para a variedade UFLA e $4,71 \times 10^5$ espermatozoide/mL para a variedade GIFT. O volume de sêmen encontrado para a GIFT foi de 0,9 mL enquanto para a UFLA foi de 0,6 mL. A motilidade espermática encontrada foi de 96,5% com duração de 4,33 minutos para a variedade UFLA e 88,4% com duração de 4,8 minutos para variedade GIFT. A quantidade de células espermáticas normais apresentou uma média de 86,35% para a variedade UFLA e 86,46% para a variedade GIFT. A indução com hCG em diferentes horários de aplicação não apresentou diferença significativa sobre os parâmetros de qualidade espermática dos machos de tilápias.

Palavras-chave: espermatozoide, espermição, GIFT, indução hormonal, UFLA.

EFFECT OF HCG APPLICATION IN MALES FROM DIFFERENT VARIETIES OF NILE TILAPIA OREOCHROMIS NILOTICUS

ABSTRACT: This study evaluated the effect of time of application of human chorionic gonadotropin (hCG) on the reproductive performance of 40 males of Nile tilapia males from varieties GIFT and UFLA. The experiment was conducted at the Water Recirculation Laboratory of the Fish Farm Station, Department of Animal Science, Federal University of Lavras - MG. The experiment was completely randomized design, in a 2 x 4 factorial scheme (two varieties and four hCG application periods) with five replicates. Twenty

males of the GIFT variety and 20 males of the UFLA variety, with microchips, were housed in a water recirculation system. The application periods were at 6 a.m., 12 a.m., 6 p.m. and 12 p.m.. The hCG dosage was performed in a single dose. The following variables were analyzed: sperm motility rate and duration, sperm morphology, semen volume and semen sperm concentration. The obtained data were submitted to variance analyses and the averages were compared by the SNK test at 5% of significance. The period of application and the variety used did not influence the analyzed variables, however the UFLA variety showed a larger number of animals that spermized. The concentration presented an average of 5.73×10^5 sperm/mL for the UFLA variety and 4.71×10^5 sperm/mL for the GIFT variety. The volume of semen found for GIFT was 0.9 mL whereas for UFLA it was 0.6 mL. The sperm motility was 96.5% with a duration of 4.33 minutes for the UFLA variety and 88.4% with a duration of 4.8 minutes for the GIFT variety. The number of normal sperm cells presented an average of 86.35% for the UFLA variety and 86.46% for the GIFT variety. Induction with hCG at different periods of application did not present significant difference on the sperm quality parameters of tilapia males.

Key words: sperm, spermiation, GIFT, hormonal induce, UFLA.

INTRODUÇÃO

As pesquisas com o método de indução hormonal, apesar de escassas, pode-se observar que quando aplicada em conjunto com o fotoperíodo e temperatura, proporciona obter resultados satisfatórios no amadurecimento gonadal de algumas espécies de peixes fora do período reprodutivo (SLATER et al. 1995). SOUZA et al. (2016) testaram a aplicação do hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG) em fêmeas de duas variedades de tilápias, a GIFT e UFLA, em diferentes tempos de aplicação. Eles observaram que a indução hormonal com hCG foi influenciada pela variedade e pelo horário de aplicação. Porém, estes fatores ainda não foram verificados para as características reprodutivas de machos de tilápias.

Reprodutores de diversas espécies criados em cativeiro apresentam espermição espontânea, mas o volume e a qualidade do sêmen podem ser aumentados com a utilização de hormônios apropriados (DONALDSON E HUNTER, 1983). A indução hormonal é muito importante no aspecto fisiológico do animal desencadeando uma série de processos vitais aos peixes durante a reprodução (YARON et al. 1980, HANSEN et al. 2001).

Segundo AMANO et al. (2004), o fotoperíodo é responsável pelo desenvolvimento gonadal, exercendo uma ação direta no eixo hipotálamo-hipófise-gonadas dos peixes teleosteos ao estimular ou inibir a produção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), de hormônios hipofisários (FSH e LH) e outros hormônios que modulam a reprodução e a

maturação dos gametas. As gonadotrofinas regulam a maturação dos gametas, estimulando as gônadas a sintetizar hormônios esteróides. Ao longo do processo de desenvolvimento gonadal, diferentes esteróides sexuais apresentam importância em cada fase, sendo que as gonadotrofinas influenciam em suas produções (HARVEY E CAROLSFELD, 1993).

Um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola, acompanhada da sustentabilidade tanto econômica como ambiental é a utilização da propagação artificial ou reprodução induzida (ROMAGOSA, 2006). Devem-se utilizar gametas de qualidade promovendo máxima fertilização e subsequente desenvolvimento normal do embrião (BOBE E LABBÉ, 2010, ROMAGOSA et al. 2010).

Para se determinar a viabilidade espermática alguns parâmetros são utilizados, como: motilidade, sobrevivência, anormalidades morfológicas e composição bioquímica do plasma seminal e podem se correlacionar com as taxas de fertilização, metodologia utilizada por SORENSEN (1979), adaptada para peixes.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do horário de aplicação hormonal utilizando hCG, sobre os parâmetros reprodutivos de machos das variedades de tilápias do Nilo GIFT e UFLA.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Recirculação de Água da Estação de Piscicultura, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras - MG, Brasil,

durante os meses de julho e agosto de 2014. Todos os animais foram oriundos dessa Estação de Piscicultura, sendo 40 machos de tilápias nilóticas *O. niloticus*, dos quais, 20 reprodutores foram da variedade GIFT e os 20 restantes da variedade UFLA, com idade média de 02 e 04 anos respectivamente, peso e comprimento total médio de $1,09 \pm 0,19$ kg e $29,643 \pm 2,14$ cm) (Autorização Protocolo nº 016/13). Os machos aptos a receberem a indução hormonal foram selecionados de acordo com as características reprodutivas citadas por PAULINO et al. (2016), onde ocorre a liberação de sêmen sob leve massagem abdominal.

Foi realizada a identificação do animal através da leitura do microchip, localizado próximo à nadadeira dorsal esquerda. Foram pesados e medidos o seu comprimento total e estes dados foram transportados para fichas e os animais acondicionados no Laboratório.

Foram mantidos na proporção de 05 animais/caixa, separados de acordo com as variedades, e cada caixa representando um momento de aplicação hormonal. Sendo utilizadas 08 caixas de polietileno com capacidade individual de 500 litros d'água, com fluxo de água e aeração contínua e temperatura da água mantida em $27,7 \pm 0,1^\circ\text{C}$, níveis de oxigênio dissolvido $6,6 \pm 1,0$ mg.L⁻¹, e pH $6,7 \pm 0,1$. Durante este período foram submetidas a um fotoperíodo de 12:12 horas de luz: escuro (L:E). Os animais receberam ração comercial extrusada contendo 36% de proteína bruta em pellets de dois milímetros de diâmetro, fornecida uma vez ao dia "ad libitum". Entretanto, antes do início da indução permaneceram em jejum por um período de 24 horas.

Os reprodutores, após o jejum, foram induzidos artificialmente por via intramuscular com gonadotrofina coriônica humana (hCG), marca comercial CHORULON 5000 UI (Laboratório Intervet Shering-Plough Animal Health) aplicado na base da nadadeira dorsal uma dose total de 05 UI por grama de peso de peixe. De acordo com a metodologia utilizada para indução de fêmeas de tilápia descrita por VALENTIN (2007) e SOUZA et al. (2016)

Os machos de cada caixa foram induzidos com dose única, conforme os horários previamente determinados, sendo: A- 6h; B- 12h; C- 18h, e D- 24h.

Para a colheita do sêmen, o animal foi retirado da caixa d'água e envolvido por uma

toalha úmida. Logo a seguir, a região genital e a nadadeira anal, foram enxutas com papel toalha para a execução do processo de retirada do sêmen, realizado comprimindo-se a região abdominal do animal no sentido ântero-posterior, sendo o sêmen recolhido em seringas de 1 mL (BILLARD et al. 1995).

Em seguida as seguintes características foram avaliadas do sêmen: volume total (mL), concentração (nº de espermatozoides/mL), taxa (%) e duração (s) da motilidade e morfologia espermática.

A taxa e duração da motilidade espermática foram verificadas em uma alíquota de 10 µL de sêmen em lâmina histológica, previamente ativado com água na proporção de 1:4 (sêmen: água) visualizados em microscópio no aumento de 400 x. A duração da motilidade foi registrada desde a ativação até que somente 10 % dos espermatozoides se encontrassem ativos (FELIZARDO et al. 2010, MURGAS et al. 2007).

Para a análise morfológica dos espermatozoides, utilizou-se uma alíquota do sêmen, diluído em formol citrato para verificação da concentração. O sêmen foi depositado sobre uma lâmina e corado com o corante Rosa Bengala. As lâminas observadas em microscópio (1000 x). Analisados 100 espermatozoides de cada amostra e registrados a porcentagem de espermatozoides normal e anormal, considerando as anormalidades de cabeça (isolada, hipercefalia e hipocefalia), da peça intermediária e da cauda (curta/quebrada, enrolada e isolada). Recomendado por (STREIT JUNIOR et al. 2004).

Para avaliação da concentração espermática, o sêmen *in natura* foi diluído em solução de formaldeído na proporção de 1:1000 (sêmen: solução). A avaliação foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico. E a concentração espermática estimada pela fórmula: (CBRA 1998).

$CE = N \times FC$; em que:

CE é a concentração espermática (espermatozoides por mm³);

N é o número de células contadas na câmara de Neubauer.

O fator de correção (FC) é dado por:

$$FC = (q \times fd)/d; \text{ em que:}$$

q = 5, e representa a razão entre o número total de quadrículos da câmara de Neubauer (25) e o

número de quadrículos contados (5);
 fd é o fator de diluição da alíquota de sêmen
 (= 10^4);
 d é a profundidade entre a lamínula e a câmara
 de Neubauer (= 0,1 mm).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×4 , onde foram testados duas variedades de tilápias e quatro horários de aplicação do hCG com cinco repetições. Assim, os dados obtidos das variáveis reprodutivas dos machos foram previamente testados quanto às pré-suposições e submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste SNK a 5% de significância, considerando um modelo estatístico hierárquico, em que os horários de aplicação de hormônios foram aninhados às variedades estudadas. As análises foram realizadas utilizando o software "R" para Windows na versão 2.13.2.

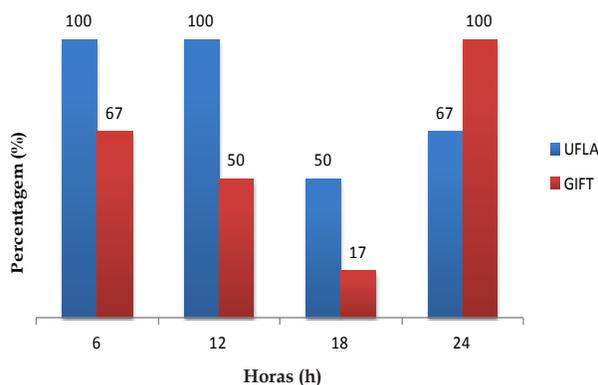
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos cinco peixes induzidos para cada horário de indução hormonal, na variedade UFLA, 100% espermiou no grupo 6 e 12 horas; e 50% e 67% espermiaram no grupo 18 e 24 horas respectivamente. Já para a linhagem GIFT estes valores foram de 67% e 50% para os grupos de indução 6 e 12 e 17% e 100% para os grupos 18 e 24 horas.

A indução hormonal aplicada às 18 horas, independente da variedade, proporcionou o menor número de animais que espermiaram (Figura 1).

Os dados reprodutivos dos machos encontram-se descritos na tabela 1, não houve

Figura 1. Percentagem (%) de tilápias induzidas que espermiaram.



diferença significativa entre os horários de aplicação e para as variedades utilizadas. A concentração espermática apresentou uma média de $5,73 \times 10^5$ espermatozoide/mL para a variedade UFLA e $4,71 \times 10^5$ espermatozoide/mL para a variedade GIFT (Tabela 1). O volume apresentou uma média de 0,9 mL para a variedade GIFT enquanto para a UFLA foi de 0,6 mL (Tabela 1).

A motilidade espermática encontrada foi de 96,5% com duração de 4,33 minutos para a variedade UFLA e 88,4% com duração de 4,8 minutos para variedade GIFT.

A quantidade de células espermáticas normais apresentou uma média de 86,35% para a variedade UFLA e 86,46% para a variedade GIFT (Tabela 1).

Identificando os tipos de patologia apresentadas na figura 2 podemos observar que as encontradas foram as de cabeça, independente do horário de aplicação ou da variedade de tilápia utilizada, embora não tenha havido diferença estatística entre os grupos.

Os machos receberam apenas uma aplicação hormonal, sendo que o período para que ocorra a extrusão é de 720 horas-grau. Para os peixes induzidos às 18 horas, início da noite, o processo de maturação gonadal induzido pelo hormônio ocorreu no período noturno. Neste período ocorre a produção da melatonina, sintetizada pela pineal e que tem a capacidade de inibir a liberação do hormônio luteinizante (LH) (CHANG et al. 2009), que de acordo com SCHULZ et al. (2010) o LH é responsável pelo rompimento dos cistos e espermição. Assim é provável que esta tendência à diminuição no número de tilápias que espermiaram possa estar relacionada com a inibição noturna endócrina.

A concentração espermática em tilápias encontrada por GENOTTE et al. (2012) foi de $1,69 \times 10^9$ e por PAULINO et al. (2016) foi de $2,44 \pm 0,4 \times 10^9$ espermatozoide/mL

Esta ampla variação observada na concentração espermática nos diferentes trabalhos, pode estar relacionado com a fase reprodutiva em que o macho se encontrava durante o momento de aplicação hormonal. A concentração espermática é maior durante os meses mais quentes, indo à época reprodutiva das tilápias entre setembro a abril. Como o

Tabela 1. Médias e desvio padrão das variáveis relacionadas a qualidade espermática nas diferentes variedades de tilápia e diferentes horários de indução.

Variáveis	Variedade	HORÁRIO				MÉDIA
		6h	12h	18h	24h	
Concentração (X 105 sptz/ml)	UFLA	7,09 ± 4,87	6,58 ± 4,73	5,11 ± 5,78	3,45 ± 3,40	5,73 ± 4,48
	GIFT	6,17 ± 1,29	7,46 ± 1,15	-	2,59 ± 2,01	4,71 ± 5,44
Volume (ml)	UFLA	0,60 ± 0,51	0,68 ± 0,32	0,60 ± 0,52	0,88 ± 0,33	0,69 ± 0,40
	GIFT	0,93 ± 0,19	0,87 ± 0,92	-	1,02 ± 0,58	0,90 ± 0,55
Motilidade (%)	UFLA	99,0 ± 2,2	94,0 ± 8,9	98,33 ± 2,9	95,0 ± 5,7	96,50 ± 5,80
	GIFT	98,7 ± 2,5	93,3 ± 5,8	-	79,0 ± 33,2	88,46 ± 21,45
Duração (min.)	UFLA	5,6 ± 2,05	2,89 ± 1,51	4,67 ± 2,31	4,28 ± 1,69	4,33 ± 2,00
	GIFT	6,48 ± 3,86	4,61 ± 4,02	-	4,25 ± 2,23	4,80 ± 3,18
Células normais (%)	UFLA	88,0 ± 2,82	86,4 ± 2,20	85,33 ± 4,61	85,0 ± 13,21	86,35 ± 6,33
	GIFT	89,0 ± 3,82	88,0 ± 4,00	-	83,20 ± 3,34	86,46 ± 4,18

experimento foi realizado em junho até agosto, pode ser que as gônadas destes animais ainda não estivessem totalmente maturadas.

De acordo com PAULINO et al. (2016) o peso do animal e a temperatura pode influenciar a quantidade de espermatozoides por mL produzidos pela tilápia. Por outro lado, GODINHO et al. (2007) afirmam que a variação na concentração espermática pode ocorrer devido a alguns fatores, como condições dos indivíduos, método de coleta e estação do ano, de acordo com BORGES et al. (2005) o tempo de coleta é uma das variáveis principais na produção de gametas de peixes.

PAULINO et al. (2016) e MATAVELLI et al. (2010) descreveram valores de volume seminal de 0,3 mL para tilápia. O menor volume seminal destes trabalhos pode indicar que o sêmen estava mais concentrado, enquanto que o observado neste trabalho estava mais diluído, contribuindo assim para a diferença entre as concentrações observadas.

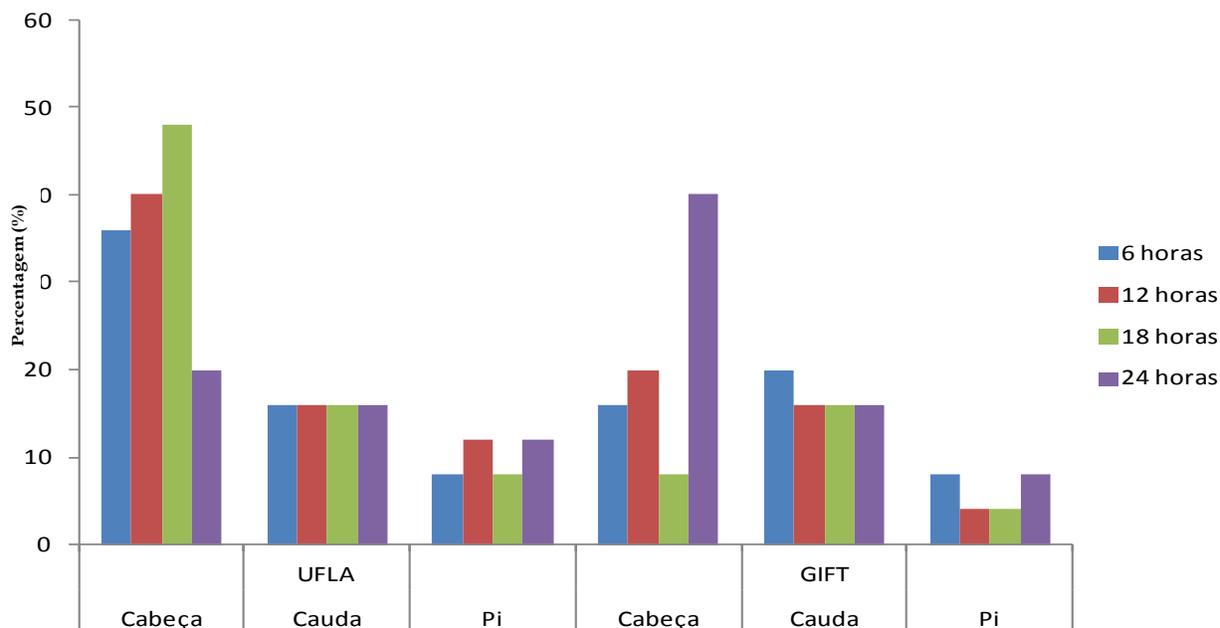
A indução hormonal no macho aumenta tanto o volume quanto a qualidade do sêmen (KAVAMOTO et al. 1996). Com o aumento do volume ocorre a diluição do

sêmen, determinando assim uma menor concentração espermática o que estaria de acordo com os resultados encontrados. Porém SÖNMEZ et al. (2005) cita que o aumento das concentrações séricas de FSH e LH atuariam aumentando a concentração espermática, o que não foi demonstrado.

A média dos valores encontrados por BOMBARDELLI et al. (2010) foram de 96% com duração de motilidade de 46 segundos. A duração de motilidade encontrada por GENOTTE et al. (2012) foi de 18 segundos, já PAULINO et al. (2016), verificaram duração de 2,55 minutos para a tilápia. A motilidade apresentou alta em relação aos outros estudos. Este parâmetro é utilizado para avaliar a qualidade espermática, tendo relação direta com a motilidade espermática (BOMBARDELLI et al. 2006, COWARD et al. 2002), e esta diferença pode ser devido a utilização da indução hormonal neste trabalho, tendo em vista que os demais autores não utilizaram este protocolo, tendo os animais espermiado naturalmente.

As quantidades de células espermáticas normais apresentadas nas variedades são bem superiores aos relatados pela literatura, onde

Figura 2. Percentagem (%) de patologias espermáticas por variedade e tempo de indução nas diferentes porções do espermatozoide.

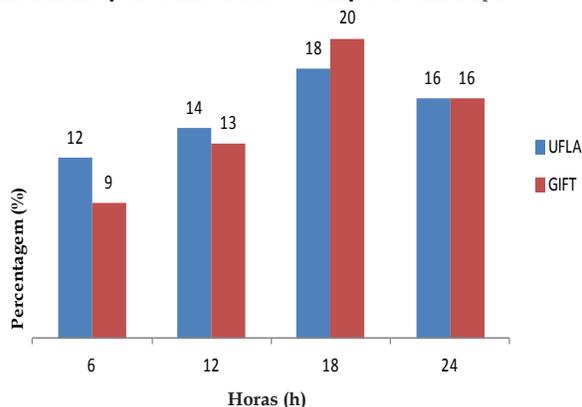


Pi = Peça Intermediária.

MATAVELI et al. (2010) relatam uma média de 16% e BOMBARDELLI et al. (2010) verificaram 50% de células normais para a espécie, porém nestes trabalhos não houve a indução hormonal. Estes valores estão dentro dos limites aceitáveis para a utilização em fertilização artificial de peixes, que segundo MURGAS et al. (2007) a percentagem crítica para a utilização na fertilização é abaixo de 50% de espermatozoides normais, visto que esta técnica envolve uma alta taxa de espermatozoide: ovócito em condições controladas.

Na figura 3 podemos observar a percentagem

Figura 3. Percentagem (%) de espermatozoides anormais por variedade e tempo de indução.



de espermatozoides anormais presentes por variedade e tempo de indução.

Para a variedade UFLA foi encontrada uma média de 15% enquanto para a variedade GIFT foi de aproximadamente 14%.

As anormalidades espermáticas têm sido citadas como possíveis causas de infertilidade ou esterilidade em peixes (COLLODEL E MORETTI, 2006).

Como os resultados encontrados para as patologias foram baixos, é possível afirmar que esta influenciou nos altos índices de motilidade espermática. Isto porque em peixes observou-se que percentagem de anomalias de sêmen em curimba (*Prochilodus lineatus*) acima de 30% já causava a diminuição da taxa de motilidade (FELIZARDO et al. 2010). O maior número de patologias encontradas foram as de cabeça e cauda, independente da variedade estudada ou do horário de indução hormonal.

CONCLUSÕES

Assim podemos concluir que a indução com hCG em diferentes horários de aplicação não apresentou qualquer influência sobre os parâmetros de qualidade espermática dos

machos de tilápia. Porém, a indução hormonal pode ter melhorado a qualidade seminal dessa espécie.

REFERÊNCIAS

- AMANO, M.; IIGO, M.; IKUTA, K.; KITAMURA, S.; OKUZAWA, K.; YAMADA, H.; YAMAMORI, K. Disturbance of plasma melatonin profile by high dose melatonin administration inhibits testicular maturation of precocious male masu salmon. *Zoological science*, v.21, p.79-85, 2004 [https://doi.org/10.2108/0289-0003\(2004\)21\[79:dopmpb\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2108/0289-0003(2004)21[79:dopmpb]2.0.co;2)
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W.; SUQUET, M. Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N.; ROBERTS R.J. (eds), **Broodstock management and egg larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p. 25-52.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. *General and comparative endocrinology*, v.165, p.535-548, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011>
- BOMBARDELLI, R.A.; MÖRSCHBÄCHER, E.F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E.A.; SYPERRECK, M.A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, p.1251-1257, 2006. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982006000500001>
- BOMBARDELLI, R.A.; HAYASHI, C.; NATALI, M.R.M.; SANCHES, E.S.; PIANA, P.A. Níveis de energia digestível sobre os desempenhos reprodutivo e zootécnico e a deposição de lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia do Nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, p.941-949, 2010. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982010000500001>
- BORGES, A.; SIQUEIRA, D.R.; JURINITZ, D.F.; ZANINI, R.; AMARAL, F.; GRILLO, M.L.; WASSERMANN, G.F. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiology Biochemistry*, v.31, p.45-53, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10695-005-4742-8>
- CHANG, J.P.; JOHNSON, J.D.; SAWISKY, G.R.; GREY, C.L.; MITCHELL, G.; BOOTH, M.A.; VOLK, M.M.; PARKS, S.K.; THOMPSON, E.; GREG, G.; GOSS, G.G.; KLAUSEN, C.B.; HAMID, R.; HABIBI, H.R. Signal transduction in multifactorial neuroendocrine control of gonadotropin secretion and synthesis in teleosts—studies on the goldfish model. *General and comparative endocrinology*, v.161, p.42-52, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.09.005>
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exames andrológicos e avaliação de sêmen animal**. 2 ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.
- COLLODEL, G.; MORETTI, E. Sperm morphology and aneuploidies: defects of supposed genetic origin. *Andrologia*, v.38, p. 208-215, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2006.00742.x>
- COWARD, K.; BROMAGE, N.R.; HIBBITT, O.; PARRINGTON, J. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v.12, p. 33-58, 2002.
- DONALDSON, E.M.; HUNTER, G.M. Induced final maturation, ovulation, and spermiation. In: HOAR W.S.; RANDALL D.J.; DONALDSON E.M. (eds). *Fish physiology*. New York: Academic, 1983. p. 351-403.
- FELIZARDO, V.O.; MELLO, R.A.; MURGAS, L.D.S.; ANDRADE, E.S.; DRUMOND, M.M.; ROSA, P.V. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba *Prochilodus lineatus* sperm. *Animal reproduction science*, v.122, p.259-263, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.020>
- GENNOTTE, V.; FRANÇOIS, E.; ROUGEOT, C.; PONTHER, J.; DELEUZE, S.; MÉLARD, C. Sperm quality analysis in XX, XY and YY males of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Theriogenology*, v.78, p.210-217, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.002>
- GODINHO, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, p. 351-360, 2007.
- HANSEN, T.; KARLSEN, Ø.; TARANGER, G.L.; HEMRE, G.L.; HOLM, J.C.; KJESBU, O.S. Growth, gonadal development

- and spawning time of Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared under different photoperiods. **Aquaculture**, v.203, p.51-67, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00610-x](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00610-x)
- HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: International Development Research Center, 1993. 144p.
- KAVAMOTO, E.T.; NARAHARA, M.Y.; MAINARDES-PINTO, C.S.R.; ANDRADE-TALMELLI, E.F.; ROMAGOSA, E.; FERRAZ, S.E.M. Efeito do hCG na produção de sêmen do curimatá *Prochilodus scrofa*, 1881. **Revista Ceres**, v.43, p.76-85, 1996.
- MATAVELI M.; MORAES, G.V.; STREIT JUNIOR, D.P.; RIBEIRO, R.P.; GASPARINO, E. Qualidade do sêmen em tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, alimentada com dietas contendo diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.32, p.345-349, 2010. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v32i3.7836>
- MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B.; FREITAS, R.T.F.; PEREIRA, G.J.M. Criopreservação do sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.526-531, 2007. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982007000300002>
- PAULINO, M.S.; VERAS, G.C.; FELIZARDO, V.O.; SOLIS-MURGAS, L.D.; FREITAS, R.T.F. Assessment of Gametes in Tilapia *Oreochromis niloticus*: Effects of Body Weight in a New Lineage. **Journal of Fisheries Sciences.com**, v.10, p.63, 2016.
- ROMAGOSA, E. Biologia reprodutiva e fisiologia de peixes em confinamento: o cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. **Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura**, p. 108-116, 2006.
- ROMAGOSA, E.; SOUZA B.E.; SANCHES, E.A.; BAGGIO, D.M.; BOMBARDELLI, R.A. Sperm mobility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 678-691, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01531.x>
- SCHULZ, R.W.; FRANÇA, L.R.C.; LAREYRE, J.J.; LEGAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; RAFAEL, R.H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**. v. 165, p. 390-411, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013>
- SLATER, C.H.; SCHRECK, C.B.; AMEND, D.F. GnRH α injection accelerates final maturation and ovulation/spermiation of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* in both fresh and salt water. **Aquaculture**, v. 130, p. 279-285, 1995. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00320-n](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00320-n)
- SÖNMEZ, M.; TÜRK, G.; YÜCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. **Theriogenology**, v.63, p. 2063-2072, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.003>
- SORENSEN JUNIOR, A.M. **A laboratory for animal reproduction**. 4th ed. Boston: American Press, 1979.
- SOUZA, U.N.; FELIZARDO, V.O.; FREITAS, R.T.F.; MELO, C.C.V.; FERREIRA, M.R.; REIS-NETO, R.V. Influência do horário de aplicação e da variedade genética em fêmeas de tilápias *Oreochromis niloticus* submetidas à indução hormonal com hCG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, p. 215-223, 2016. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-7716>