



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ALTAMIRA
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ADRIELE LIMA DA SILVA

**EFEITO DA INDUÇÃO HORMONAL NA QUALIDADE ESPERMÁTICA
DE *Hypancistrus zebra* Isbrücker & Nijssen, 1991
(SILURIFORMES:LORICARIIDAE)**

Altamira-Pará
Dezembro de 2019

ADRIELE LIMA DA SILVA

**EFEITO DA INDUÇÃO HORMONAL NA QUALIDADE ESPERMÁTICA
DE *Hypancistrus zebra* Isbrücker & Nijssen, 1991
(SILURIFORMES:LORICARIIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso
entregue à Faculdade de Ciências
Biológicas como requisito parcial
para obtenção do título de licenciada
em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Melo de Sousa

Coorientadora: Dra. Jôsie Schwartz Caldas

Altamira-Pará


Dezembro de 2019

ADRIELE LIMA DA SILVA

**EFEITO DA INDUÇÃO HORMONAL NA QUALIDADE ESPERMÁTICA
DE *Hypancistrus zebra* Isbrücker & Nijssen, 1991
(SILURIFORMES:LORICARIIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à aprovação pela banca
composta por:


Orientador:



Prof. Dr. Leandro Melo Sousa

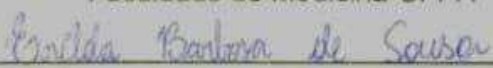
Faculdade de Ciências Biológicas-UFPA

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Fernanda Nogueira Valentin

Faculdade de Medicina-UFPA



Erilda Barbosa de Sousa

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação-UFPA

Suplentes:

Fábio José Torres de Barros

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação-UFPA

Profa. Dra. Karina Dias da Silva

Faculdade de Ciências Biológicas-UFPA

Altamira-Pará/ 06 de Dezembro de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L732e Lima da Silva, Adriele
EFEITO DA INDUÇÃO HORMONAL NA QUALIDADE
ESPERMÁTICA DE *Hypancistrus zebra* Isbrücker & Nijssen,
1991 (SILURIFORMES:LORICARIIDAE) / Adriele
Lima da Silva. — 2019. 37 f.
: il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Leandro Melo de Sousa
Coorientação: Prof^a. Dra. Jôsie Schwartz Caldas
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Faculdade de Ciências Biológicas, Campus Universitário de
Altamira, Universidade Federal do Pará, Altamira, 2019.

1. Aquicultura. 2. reprodução animal. 3. hipofização.
4. conservação. I. Título.

CDD 636.082

EPÍGRAFE

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira ao seu favor.”

(Johann Goethe)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Adriano Silva e Lucineia Rech, o apoio e incentivo de vocês permitiu que a minha caminhada se tornasse menos árdua.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Pará e à Faculdade de Ciências Biológicas pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal e por todo apoio acadêmico e financeiro, os quais foram cruciais para o alcance deste objetivo. Em especial aos professores da FCB por todos ensinamentos valiosos que me foram passados.

Ao professor Leandro Sousa pela orientação, paciência, ensinamentos ao longo desses anos, por acreditar no meu trabalho, por ter me aceitado em seu laboratório e ter compartilhado um pouco de seus conhecimentos comigo. À coorientadora Jôsie Caldas por toda ajuda e ensinamentos, por todo seu carinho com a realização desta monografia e por confiar no meu trabalho. À professora Tatiana Pereira, pela ajuda acadêmica, pelas palavras de incentivo e motivação.

Ao LAQUAX, pelas experiências incríveis e as pessoas que compõem o laboratório: Didi, Vanessa, Cida, Letícia, Diones, Maylon, Isadora, Aline e Fábio grata por todas as conversas e a convivência diária que foram essenciais, além de toda a ajuda nos momentos que precisei. Ao Iann Monteiro que mesmo com pouco tempo de convivência me fez uma grande contribuição acadêmica e à Erilda Sousa que foi muito importante e sempre se fez disponível nos momentos que precisei, sempre com ótimos ensinamentos e ótimas dicas. Muito obrigada pela oportunidade de ter feito parte desta linda equipe.

Ao meu pai, Adriano Silva e minha madrasta Lucineia Rech, pela base familiar e por nunca medirem esforços em me ajudar e que mesmo com tão pouco me fizeram rica com o apoio, amor e carinho, sendo estes meus alicerces nesses quatro longos anos. E a meus irmãos, Andressa Silva, Beatriz Silva, Tamyres Silva e Danylo Silva que sempre estiveram felizes por minhas conquistas e que mesmo em momentos que me fiz ausente, não deixaram de me apoiar.

A meus avós Alzira e Benedito por sempre me apoiarem, me ajudarem e acreditarem em mim. As minhas tias Anelita Rech e Jacy Braga que mesmo de longe me confortavam com palavras de carinho e sempre torceram pelo meu sucesso. A minha madrinha Helena Silva e minhas tias Geane Silva, Camila Rech, Juliana Rech

e Dayane Rech que se fizerem presentes em todos os momentos, pela torcida e pelo carinho.

A minha mãe Aparecida Feitosa por toda a ajuda, a Alcione Dias por sempre estar disposta a me ajudar e sempre torcer por mim. E um agradecimento especial a Jucenilda Araújo e Evaldo, que sempre me receberam de portas abertas em sua casa, todas as vezes que precisei permanecer em Altamira, além de estarem presentes em muitos momentos importantes.

Agradeço também à turma Biologia 2016, gratidão por todos os momentos felizes e tristes compartilhados e todos os ensinamentos que cada um nos proporcionou. Às amigadas que fiz e que vão além do ambiente acadêmico, Lucimar Melo e Leydiane Oeiras, obrigada pela amizade e incentivo.

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos Laisa Nayarla, Magdiele Carvalho, Alice Martins, Silvia Juliane, Rodrigo Frutuoso, Adjair Dutra e Wenderson Lima por estarem sempre presentes, pelas mensagens, apoio e pelos momentos de distração.

À Neury Carla, seu Carlos e dona Neide que deste que passei no vestibular me ajudaram imensamente, pela mensagem mais linda que já li e por sempre se preocuparem, muito obrigada.

A todos, fica aqui registrada minha imensa gratidão.

RESUMO

A conservação da ictiofauna tem sido um grande desafio diante de ações antrópicas que são resultantes do elevado interesse econômico atual, os quais acarretam na superexploração de recursos naturais. Uma destas ações foi a Usina Hidrelétrica de Belo Monte, que ocasionou a desestruturação da região do Médio Xingu, que possui um ambiente rico em corredeiras e diversidade de espécies. *Hypancistrus zebra* é uma espécie endêmica dessa região e se encontra ameaçada de extinção, devido à sobrepesca destinada ao mercado aquarista e agravada com a implementação da UHE Belo Monte, que desestruturou a qualidade ambiental e o curso do rio. Diante disso, é notória a importância de estudos que visem a conservação de espécies que são ameaçadas em decorrência da construção destes empreendimentos e uma das alternativas é a reprodução *ex situ*. Dessa forma, é importante se avaliar a qualidade espermática destas, sendo crucial para determinação do sucesso de fertilização. Tal análise é baseada no estudo qualitativo de alguns parâmetros seminais e espermáticos como volume do sêmen coletado, concentração espermática, taxa de motilidade espermática, duração da motilidade, vigor espermático, integridade de membrana e morfologia espermática. Para tanto, se é utilizado indutores hormonais, entre eles o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), o qual foi utilizado neste estudo e se mostrou eficaz nos parâmetros de vigor espermático, aumentando a qualidade do espermatozoide, para morfologia espermática normal, sendo diminuído a quantidade de anomalias espermáticas em peixes induzidos e, no volume seminal, com o aumento na produção de fluído seminal que permite uma maturação final dos gametas mais eficaz. Logo, se observou que o EBHC permite uma maior qualidade seminal e não tem ação direta na espermatogênese.

Palavras-chaves: Aquicultura, reprodução animal, hipofização, conservação.

ABSTRACT

Ichthyofauna conservation has been a major challenge in the face of anthropic actions resulting from the current high economic interest, which result in the overexploitation of natural resources. One of these actions was the Belo Monte Hydroelectric Power Plant, which caused the disruption of the Middle Xingu region, which has an environment rich in rapids and species diversity. *Hypancistrus zebra* is an endemic species of this region and is threatened with extinction due to overfishing for the aquarium market and aggravated by the implementation of Belo Monte HPP, which has disrupted the environmental quality and the course of the river. Given this, the importance of studies aimed at the conservation of species that are threatened as a result of the construction of these enterprises is notorious and one of the alternatives is ex situ reproduction. Thus, it is important to evaluate their sperm quality, being crucial to determine the success of fertilization. Such analysis is based on the qualitative study of some seminal and sperm parameters such as collected semen volume, sperm concentration, sperm motility rate, motility duration, sperm vigor, membrane integrity and sperm morphology. Therefore, if hormonal inducers are used, among them crude carp pituitary extract (EBHC), which was used in this study and was effective in the parameters of sperm vigor, increasing the quality of sperm for normal sperm morphology. decreased sperm anomalies in induced fish and seminal volume, with increased seminal fluid production allowing more effective final gamete maturation. Therefore, it was observed that EBHC allows a higher seminal quality and has no direct action on spermatogenesis.

Keywords: Aquaculture, animal reproduction, hypophization, conservation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos Específicos	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 Delineamento amostral	7
3.2 Procedimentos experimentais	7
3.2.1 Indução hormonal	7
3.2.2 Anestesia	8
3.2.3 Coleta seminal	8
3.3 Análise estatística	10
RESULTADOS	12
4. DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÃO	21
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. INTRODUÇÃO

Hypancistrus zebra, conhecido popularmente como “acari-zebra”, “zebra-imperial”, pertence à subfamília Ancistrini da ordem Siluriformes e é caracterizada pelo seu pequeno porte, atingindo em média 8 cm quando adulto, corpo com listras oblíquas brancas e pretas dispostas horizontalmente ao longo do corpo e lateralmente na região da cabeça, formando um “E” no focinho (ARMBRUSTER; LUJAN; TAPHORN, 2007). (Figura 1)



Figura 1. *Hypancistrus zebra* adulto em toca feita com barro, contida em aquário. Foto: arquivo pessoal.

Esta espécie é endêmica da região denominada Volta Grande, na bacia hidrográfica do Xingu, ocorrendo em uma área com aproximadamente 100 Km (CARDOSO et al., 2016). Esta região se caracteriza pela abrangência de águas lólicas, as quais determinam condições cruciais para a sobrevivência da espécie, bem como a elevada presença de oxigênio dissolvido, existência de sedimentos, as quais conferem abrigo e proteção, e as poucas fontes de matéria orgânica (MAGALHÃES, 2018).

O Rio Xingu, com sua extensão de 520.000 Km²(SOUSA, 2015) é uma bacia com rica história geomorfológica que resultou em uma diversidade de micro-habitats,

principalmente os de corredeira, que conseqüentemente acarretam em uma ampla diversidade de espécies (SAWAKUCHI et al., 2015). Dentre os peixes ocorrentes neste rio e especificamente em corredeiras se destacam as espécies da família Loricariidae da ordem Siluriformes, conhecidos popularmente como cascudos, plecos, acaris (CAMARGO; GIARRIZZO; ISAAC, 2004). Essa bacia possui cerca de 60 espécies de loricarídeos, agrupadas em 25 gêneros, sendo que 18 espécies são endêmicas e cerca de 15 ainda não são descritas (CRAMER; SOUSA, 2016)

Dentre as espécies da família Loricariidae, *H. zebra* é considerada uma das espécies de maior importância ornamental, o que ocasionou sua demasiada pesca para o mercado aquarista desde o fim da década de 1980, o que acarretou na diminuição da população desta espécie (PEREIRA, 2018). E devido a sua sobrepesca e característica de espécie K estrategista (ADAMS, 1980; WINEMILLER, 1989) baseado em um conjunto de características (VAZZOLER, 1996), como por exemplo ter poucas reproduções ao longo do ano e, ainda, baixa fecundidade, (média de 13 ovos por reprodução) (RAMOS, 2016), levou-se sua classificação no Livro Vermelho como Espécie Ameaçada de Extinção (ICMBIO, 2018).

Hypancistrus zebra, possui uma elevada importância no mercado aquarista por suas características como padrão de coloração, pequeno porte, formato corporal e por ser considerado um animal de deslocamento lento, além do seu elevado valor (PEREIRA, 2018). Como sua captura é proibida, sua criação em cativeiro é um importante mecanismo para a conservação e preservação de espécies ameaçadas de extinção.

Dentre os estudos já realizados com a espécie alguns tratam sobre os diferentes fenótipos da espécie (CARDOSO et al., 2016), sobre o genoma mitocondrial

(MAGALHÃES et al., 2017), como a temperatura influencia no comportamento do animal (CRUZ, 2017), a biodiversidade molecular desta espécie (MAGALHÃES, 2018) e sobre os tipos de abrigos mais eficientes para a criação destes em aquários (FUJIMOTO et al., 2014).

Entretanto, mesmo o Brasil possuindo a biodiversidade aquática mais rica do mundo, ainda não se há mecanismos de reprodução em larga escala dessas espécies. Muitas tentativas de reprodução são realizadas, mas a lacuna sobre a ecologia e reprodução das espécies, principalmente ornamentais, ainda é grande e isso ocasiona uma grande perda de espécimes (RAMOS, 2016). Segundo o mesmo autor, a aquariofilia nos demais países apresenta um elevado conhecimento sobre as espécies e na aplicação de tecnologias, que resultam na reprodução eficaz de *Hypancistrus zebra* em cativeiro.

Diante disso, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos que forneçam conhecimentos sobre espécies com risco de extinção para que se estabeleça medidas para conservação das mesmas, frente a grandes impactos ambientais causados por ações antrópicas, como é o caso da construção de Usinas Hidrelétricas.

A reprodução *ex situ* é uma alternativa para mitigar estes impactos a espécies ameaçadas de extinção. Entretanto, a reprodução de peixes é dependente de fatores ambientais, tais como: parâmetros físico-químicos da água; disponibilidade de recursos; idade de maturação e migração, sendo este último, uma característica primordial para uma representatividade de peixes da bacia amazônica (LIMA, 2015).

Para que ocorra a reprodução *ex situ* de espécies que dependem de determinadas variáveis ambientais, utiliza-se indutores hormonais para induzir esta ação, tais como: o extrato bruto de hipófise de carpa (LENZ et al., 2018; RICARDO;

GUERREIRO, 2015), ovopel (CARVALHO, 2016); acetato de buserelina (PAULINO et al., 2011), gonadorelina (JÚNIOR; BOMBARDELLI; NUÑER, 2017). Esses hormônios agem no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (ALMEIDA, 2013), estimulando a maturação final de gametas (SOUSA, 2015) através da sua ação nos processos endócrinos relacionados a funcionamento gonadal dos peixes (ALMEIDA, 2013), resultando em reprodução.

Entre esses, o extrato bruto de hipófise de carpa é comumente utilizado na aquicultura (ARIKI, 2019; EMBRAPA, 2012; LOPES et al., 2015; PASSINI et al., 2013; PINHEIRO et al., 2016; STREIT JUNIOR et al., 2003), por sua fácil aplicabilidade e processo de armazenamento, não dependendo de refrigeração, sua dosagem pode ser obtida facilmente baseada no peso do animal que será induzido, além de não interferir no processo de gametogênese (LENZ et al., 2018). Entretanto, hipófises podem conter quantidades distintas de hormônios, podendo influenciar no resultado de indução (CARVALHO, 2016). O mesmo autor também relata que outra dificuldade encontrada é a disponibilidade de espécies adequadas para obtenção desta glândula.

Além disso, o efeito destes hormônios sobre a maturação final de gametas sofre influência da dosagem aplicada e da temperatura em que os animais são acondicionados após o processo de indução (CARVALHO, 2016; DA SILVA OLIVEIRA, 2016). Sendo necessário o monitoramento da temperatura da água a cada hora após a indução hormonal para obtenção do somatório das unidades térmicas acumuladas (UTAs) que, em conjunto ao acompanhamento da evolução do comportamento reprodutivo, indicará a hora-grau estimada para a espécie, ou seja, o momento em que os peixes estarão prontos para a liberação de seus gametas (FILHO; WEINGARTNER, 2007). Para a padronização de seu trabalho de coleta de sêmen do

Hypancistrus zebra, Caldas e Godoy (2019), estimaram a hora-grau de 245 UTAs, obtida 8:30h após a hipofização, a uma temperatura de 28°C.

Como já demonstrado em alguns estudos, o uso de indutores hormonais pode influenciar a qualidade de alguns parâmetros seminais e espermáticos. Sabendo-se que já foi realizada a caracterização seminal de *Hypancistrus zebra* por Caldas e Godoy (2019) através de indução hormonal com hipófise de carpa, considera-se importante avaliar o efeito deste indutor para que assim, a reprodução induzida da espécie seja eficiente.

Diante disso, o presente estudo visa analisar o efeito da indução hormonal na qualidade espermática do sêmen de *Hypancistrus zebra*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a influência da indução hormonal com uso de hipófise de carpa na qualidade espermática de *Hypancistrus zebra*.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar as características espermáticas entre os tratamentos induzidos por EBHC e não induzidos;
- Avaliar características espermáticas: taxa de motilidade, vigor espermático, duração da motilidade e integridade de membrana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento amostral

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Aquicultura de Peixes Ornamentais do Xingu (LAQUAX), na Universidade Federal do Pará, campus de Altamira, no período de 25 a 30 setembro de 2019 sob autorização do comitê de ética para uso animal em pesquisa (CEUA) nº 274188368-80/UFPA. Os indivíduos da espécie *Hypancistrus zebra* utilizados nos experimentos foram adquiridos sob autorização do SISBIO (licença nº47941-5).

A qualidade da água do aquário em que os peixes estavam acondicionados, foi constantemente monitorada, mantendo os padrões naturais do rio Xingu, sendo pH entre 6,5 e 7,0, temperatura de 28 a 32° C e condutividade elétrica abaixo de 100 mS/cm³ (ARIKI, 2019). Os indivíduos foram originalmente alocados em aquários de 60 L, com densidade de estocagem de 0,5 cm/L (peixe/água), sendo estes pertencentes ao laboratório e permanecem sob cuidados há mais de seis meses.

Para a alimentação dos peixes foram utilizadas ração seca comercial da marca Dr. Bassler Biofish Food, sendo composta de 54 % de proteína, 16 % de óleo e gordura bruta, 4 % de fibra e 10 % de cálcio, e tendo alimentação fornecida uma vez ao dia.

3.2 Procedimentos experimentais

3.2.1 Indução hormonal

Neste estudo foram utilizados 48 espécimes de *Hypancistrus zebra* com peso médio de aproximadamente 5 g. Os animais foram divididos em dois grupos, com 24 peixes cada, para realização de dois tratamentos: um de indução hormonal com

extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), na concentração de 3 mg.kg⁻¹ por peixe; e, outro sem indução hormonal.

A solução indutora de EBHC foi previamente preparada, a partir da maceração com gral e pistilo, de uma hipófise de 3 mg, acrescida de uma gota de glicerina (para aglutinar as partículas) e 1 mL de solução salina fisiológica (0,9% NaCl) para diluição da solução hormonal (ZANIBONI-FILHO; WEINGAETNER, 2007). Alíquotas dessa solução foram utilizadas proporcionalmente à massa de cada peixe.

3.2.2. Anestesia

Tanto para o procedimento de indução hormonal, quanto para o procedimento de coleta seminal, os peixes foram anestesiados individualmente, previamente, em banho de solução de Eugenol, na concentração de 30 mg/ L, adequada para espécie conforme testes pilotos de anestesia. Quando acondicionados a solução foi observado o efeito da sedação até o momento que o peixe não respondesse aos estímulos e perdesse o equilíbrio, permanecendo com a parte ventral do corpo voltada para cima (PINHEIRO et al., 2016).

3.2.3 Coleta seminal

Após o procedimento de anestesia individual, cada peixe foi avaliado quanto a sua biometria, para o lote de peixes do tratamento de indução hormonal, a mensuração da massa possibilitou o preparo da injeção, a qual foi aplicada intraperitonealmente, na base da nadadeira peitoral direita, no sentido caudal-cranial, em seguida, o peixe foi introduzido em aquário de recuperação de anestesia.

Após induzidos hormonalmente e recuperados da anestesia, os peixes foram acondicionados em aquários de 30 L de capacidade, dotados de equipamentos de oxigenação, filtragem e aquecimento. A temperatura da água foi monitorada a cada

hora, para a verificação de 245 unidades térmicas acumuladas (UTA), conforme procedimentos de Caldas e Godoy (2019).

Após aproximadamente 8:30 h do processo de indução, à temperatura de 28° C, atingindo-se 245 UTA, os mesmos peixes induzidos anteriormente, tiveram seu sêmen coletado segundo método mostrado em Caldas (2018) e Caldas e Godoy (2019). Ambos os lotes de peixes dos dois tratamentos tiveram o seu sêmen coletado individualmente após novo procedimento de anestesia individual, realizado conforme mencionado anteriormente.

O volume de sêmen coletado foi estimado a partir da relação (volume = massa / densidade), onde: a massa de sêmen foi mensurada a partir da diferença de massa entre as ponteiras com sêmen e ponteira vazia; a densidade, obtida por meio da mesma relação, utilizando ponteira com volume conhecido e massa da mesma.

O sêmen coletado foi avaliado quanto à ausência de ativação prévia por contato com água, fezes ou urina (CRBA, 1998; FILHO et al., 2015; EMBRAPA, 2012), quando não ativo, foi ativado com solução salina de 0,29% de NaCl (LOPES et al., 2015), sendo avaliada imediatamente após a ativação, a taxa de motilidade (percentual de espermatozoides com movimentação progressiva) (ARRUDA et al., 2015); o vigor espermático (pontuação de 0 a 5, sendo o maior vigor para o 5) (TSUNEDA et al., 2015); duração da motilidade (tempo em que os espermatozoides permanecem em movimentação)(ANDRADE-TALMELLI; KAVAMOTO; FENERICH-VERANI, 2001).

O sêmen fresco também foi avaliado quanto à Integridade de membrana plasmática (percentual de espermatozoides com membrana íntegra), a partir de contagem de 100 espermatozoides de esfregaço celular confeccionado com 2 µL de sêmen e 2 µL de cada dos corantes Eosina Y 5% e Nigrosina 10% (espermatozoides pouco corados são considerados íntegros e fortemente corados de rosa ou vermelho,

apresentando tamanho alterado, são considerados com membrana não íntegra) (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2016; VIVEIROS et al., 2012).

Uma alíquota de sêmen de 1µL foi fixada em 1000 µL de Formol Salina tamponado para a avaliação de concentração espermática em Câmara de Neubauer (CALDAS, 2018). A solução fixadora tamponada foi preparada dissolvendo 1,8% de NaCl (150 mL), 4,3% Na₂HPO₄ (71,4 mL), 4,5% KH₂PO₄ (28,6 mL) e 37% de solução comercial de formaldeído (62,5 mL) em 500 mL de água destilada (HANCOCK, 1957).

O sêmen remanescente foi fixado em 500 µL de Formol Salina Tamponado para a avaliação da morfologia espermática a partir da confecção de esfregaço celular de cada amostra com corante Rosa de Bengala, na proporção (3:1/ sêmen: corante), ou seja, 15 µL de sêmen e 5 µL de corante, sendo contabilizadas 100 espermatozoides em cada esfregaço de amostra e observado em microscopia óptica (Leica, na magnificação 400x) (MARIA et al., 2011).

O percentual de espermatozoides normais e anormais foi avaliado (SOARES et al., 2010), bem como, a frequência de ocorrência das anomalias: macrocefalia (Macro), microcefalia (Micro), cabeça degenerada (CD), cabeça isolada (CI), flagelo quebrado (FQ), flagelo enrolado (FE), peça intermediária degenerada (PID), sendo as mesmas, classificadas em anomalias maiores e menores (BLOM, 1973). Esses dados foram apresentados em gráficos, os quais foram elaborados no programa Excel 2016.

3.3 Análise estatística

Todos os dados foram expressos em média ± desvio padrão, com exceção das anomalias espermáticas, que foram expressas em percentuais de frequência de ocorrência relativa.

A distribuição normal dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedascidade pelo teste de Levene. As médias dos dados paramétricos (motilidade espermática, duração da motilidade, integridade de membrana, concentração espermática, morfologia espermática, volume coletado) foram analisadas pelo teste t de Student. Quando não paramétricos, os dados foram analisados pelo teste Mann-Whitney (vigor espermático e concentração de espermatozoides pelo volume de sêmen coletado). Em todas as comparações, $P < 0,05$ foi considerado para indicar significância estatística. Para esta avaliação, o software Ambiente R Studio, versão 1.2.1335 (2009) foi utilizado.

RESULTADOS

No presente estudo, observou-se que o extrato bruto de hipófise de carpa melhorou a qualidade do sêmen de *Hypancistrus zebra*, nos parâmetros: vigor espermático, morfologia espermática normal e volume seminal, ($3,30 \pm 0,47$ pontos; $93,24 \pm 4,37\%$; $48,25 \pm 27,61 \mu\text{L}$), respectivamente, diferindo significativamente ($p < 0,05$) do sêmen de *Hypancistrus zebra* não induzidos hormonalmente ($2,88 \pm 0,50$ pontos; $87,82 \pm 6,48\%$; $31,68 \pm 13,98 \mu\text{L}$), respectivamente.

Os peixes induzidos hormonalmente mantiveram a qualidade do sêmen, quanto aos parâmetros taxa de motilidade espermática, duração de motilidade espermática e integridade de membrana plasmática ($93,50 \pm 15,65\%$; $9,79 \pm 4,09$ minutos; $98,95 \pm 3,69 \%$) respectivamente, sem diferir significativamente do sêmen de peixes não induzidos hormonalmente ($p > 0,05$), ($91,25 \pm 17,08\%$; $8,49 \pm 4,12$ minutos; $98,57 \pm 2,34 \%$) respectivamente, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Espermograma da espécie *Hypancistrus zebra* com indução hormonal de 3 mg.kg⁻¹ de Extrato Bruto de Hipófise de Carpa (EBHC) (n=24, 4,60 ± 1,22 g) e sem indução hormonal (n=24, 4,88 ± 1,23 g).

Parâmetros espermáticos	Tratamentos		Significância
	Com EBHC	Sem Indução hormonal	Valor de P
Vigor (0-5) **	3,30 ± 0,47	2,88 ± 0,50	0,0231
Morfologia Normal (%) *	93,24 ± 4,37	87,82 ± 6,48	0,0134
Volume (µL) *	48,25 ± 27,61	31,68 ± 13,98	0,0496
Motilidade (%) *	93,50 ± 15,65	91,25 ± 17,08	0,6832
Duração da Motilidade (minutos)*	9,79 ± 4,09	8,49 ± 4,12	0,3574
Integridade de Membrana (%) *	98,95 ± 3,69	98,57 ± 2,34	0,7375
Concentração (nº espermatozoides. mL⁻¹) *	0,333 ± 0,206x10⁶	0,536 ± 0,269x10⁶	0,0268
Concentração (nº espermatozoides no volume de sêmen coletado) **	0,019121 ± 0,013685x10 ⁶	0,019403 ± 0,013475x10 ⁶	0,9274

Valores destacados em negrito, representam as diferenças significativas.

Dados expressos em Média ± Desvio Padrão. (*) As Médias dos dados paramétricos diferem (p < 0,05) pelo teste t Student (**) Os dados não paramétricos diferem (p < 0,05) pelo teste Mann-Whitney.

O parâmetro de concentração espermática nos espécimes induzidos, obtidas através da análise de uma amostra em câmara de Neubauer foi diferente (0,333 ± 0,206x10⁶ mL) em relação ao do observado nos espécimes não induzidos (0,536 ± 0,269x10⁶ mL) (P < 0,05). A concentração de espermatozoides no volume total de sêmen coletado não possui diferença significativa (P > 0,05), sendo de 0,019403 ±

0,013475x10 μ L e 0,019121 \pm 0,013685x10 μ L, nos experimentos induzidos e não induzidos respectivamente.

Para os parâmetros que atenderam os preceitos de normalidade e homocedasticidade, foi aplicado o teste t Student, sendo estes parâmetros: motilidade espermática (t=0.41, GL=34, P=0.6832), duração da motilidade (t=0.93346, GL=33, P=0.3574) e integridade de membrana (t=0.33811, GL=32, P=0.7375), mas não foi significativo, indicando que não há diferença entre médias dos tratamentos de indução e não indução.

Já os parâmetros que atenderam aos preceitos de normalidade e homocedasticidade e tiveram significância no teste t indicam que houve diferença entre os dois tratamentos, os quais são concentração espermática / mL (t=-2,334, GL=28, P=0.0268) (Figura 2), volume de sêmen (t=2.0459, GL=30, P=0.0496) (Figura 3) e a diferença das médias de morfologia normal (t=2,6517, GL=26, P=0.0134) (Figura 4).

Para os parâmetros que não atenderam os preceitos de normalidade e homocedasticidade, utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Witney, sendo significativo para parâmetro de vigor espermático e indicando que há diferença entre médias dos tratamentos (P=0.0231, w=195) (Figura 5) e para a concentração espermática por volume coletada não foi significativo para este teste (P=0.9274, w=77), indicando que não houve diferença entre os indivíduos induzidos e não induzidos.

O sêmen dos peixes induzidos e não induzidos com EBHC apresentaram 6,76 \pm 4,64 % e 12,18 \pm 6,48% de espermatozoides anormais, respectivamente (Figuras 2 e 3). Nenhuma anomalia espermática foi superior à 5% no sêmen após o tratamento

com EBHC (Figura 2) e 5,5% no sêmen sem tratamento de indução hormonal (Figura 3).

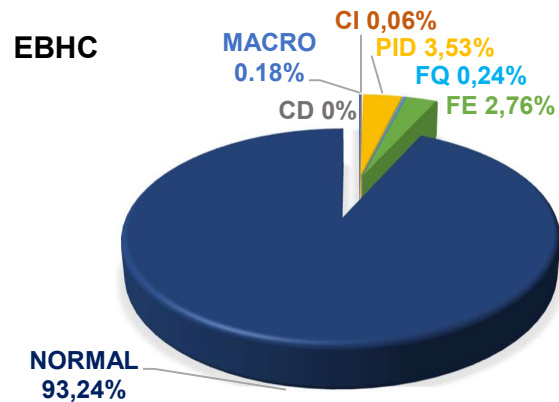


Figura 2. Morfologia espermática de *Hypancistrus zebra* após tratamento com indução hormonal com Extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC). Percentuais de espermatozoides normais e espermatozoides com anomalias espermáticas. **Anomalias:** Macrocefalia (MACRO); Cabeça isolada (CI); Cabeça degenerada (CD); Peça intermediária degenerada (PID); Flagelo quebrado (FQ); Flagelo enrolado (FE);

SEM INDUÇÃO HORMONAL

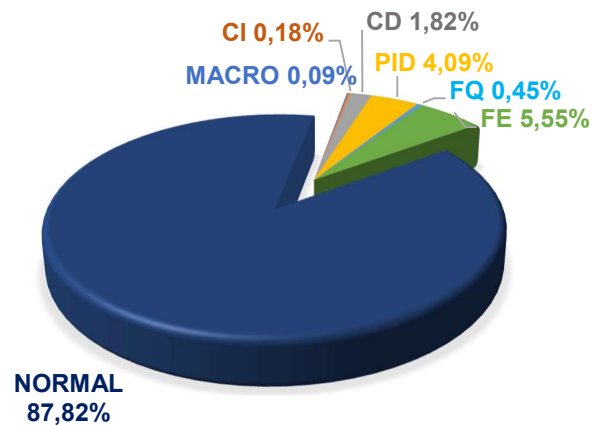


Figura 3. Morfologia espermática de *Hypancistrus zebra* sem indução hormonal. Percentuais de espermatozoides normais e espermatozoides com anomalias espermáticas. **Anomalias:** Macrocefalia (MACRO); Cabeça isolada (CI); Cabeça degenerada (CD); Peça intermediária degenerada (PID); Flagelo quebrado (FQ); Flagelo enrolado (FE);

As anomalias de maior frequência de ocorrência entre o total de anomalias observadas no sêmen após o tratamento com EBHC foram peça intermediária

degenerada 52% e flagelo enrolado 41% (Figura 4). Demais anomalias não ultrapassaram 3% em todos os espermatozoides observados.

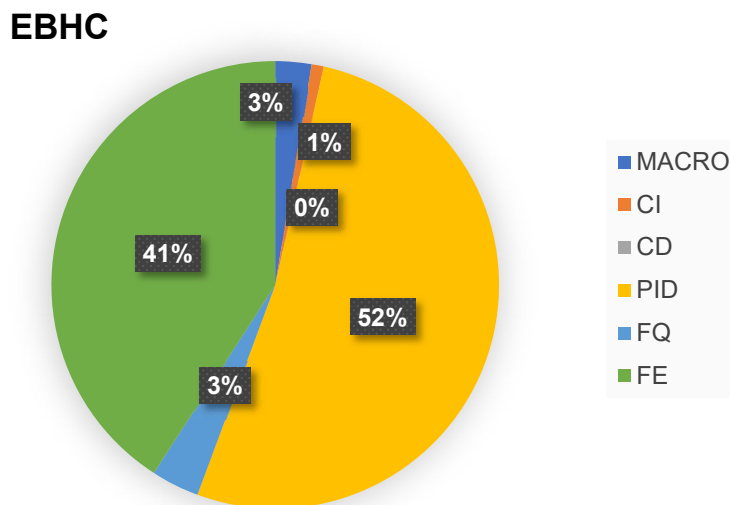


Figura 4. Morfologia espermática de *Hypancistrus zebra* após tratamento com indução hormonal com Extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC). Percentuais de anomalias espermáticas no total de espermatozoides observados. **Anomalias:** Macrocefalia (MACRO); Cabeça isolada (CI); Cabeça degenerada (CD); Peça intermediária degenerada (PID); Flagelo quebrado (FQ); Flagelo enrolado (FE);

As anomalias de maior frequência de ocorrência no total de anomalias observadas no sêmen dos peixes sem indução hormonal foram flagelo enrolado (45%), peça intermediária degenerada (34%) e cabeça degenerada (15%) (Figura 5). Demais anomalias não ultrapassaram 4% em todos os espermatozoides observados. Não foram observadas cabeças degeneradas no sêmen de peixes induzidos hormonalmente.

SEM INDUÇÃO HORMONAL

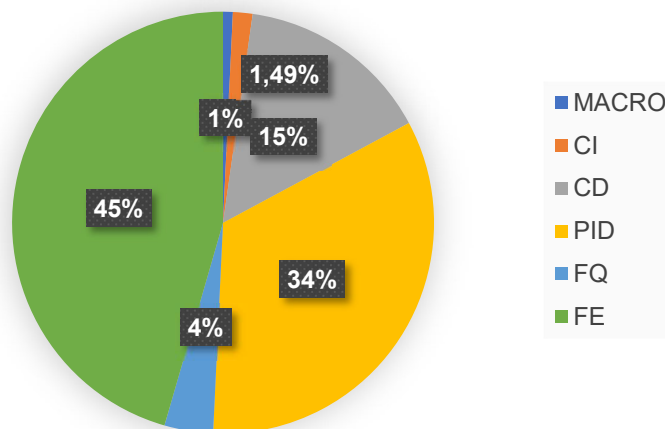


Figura 5. Morfologia espermática de *Hypancistrus zebra* sem indução hormonal. Percentuais de anomalias espermáticas no total de espermatozoides observados. **Anomalias:** Macrocefalia (MACRO); Cabeça isolada (CI); Cabeça degenerada (CD); Peça intermediária degenerada (PID); Flagelo quebrado (FQ); Flagelo enrolado (FE);

4. DISCUSSÃO

A qualidade espermática é o fator determinante para o sucesso reprodutivo das espécies, podendo variar por diversos fatores como a alimentação, a espécie, doenças, variáveis ambientais, condições em que estão confinados ou até mesmo os efeitos recorrentes do uso de indutores hormonais (STREIT JR et al., 2006).

No presente estudo, observou-se que o indutor hormonal melhorou a qualidade do sêmen de *Hypancistrus zebra*, nos parâmetros: vigor espermático, morfologia espermática normal e volume seminal. O aumento do vigor espermático pode ter sido influenciado pela ação indireta que a hipófise de carpa exerce sob o ducto espermático, permitindo maior sucesso na reprodução artificial (STREIT JUNIOR et al., 2003; STREIT JR et al., 2006).

Os percentuais de morfologia espermática normal em ambos os tratamentos foram superiores ao encontrado no trabalho de Caldas e Godoy (2019), sendo que no tratamento de indução hormonal há uma quantidade ainda maior de células normais, o que pode ser esclarecido pelo fato da ação deste hormônio no ducto espermático e que por sua vez, auxilia na maturação final do espermatozoide e maior hidratação com maior produção de fluido seminal e conseguinte, permite uma maior integridade na estrutura destes gametas (MYLONAS; DUNCAN; ASTURIANO, 2017). Dessa forma, o percentual de anomalias espermáticas foi proporcionalmente menor.

Entre as anomalias encontradas no sêmen de *H. zebra* não induzidos hormonalmente, cabeça degenerada (CD), peça intermediária degenerada (PID) e flagelo enrolado (FE), obtiveram a maior frequência de ocorrência. As anomalias CD e PID são consideradas defeitos maiores e FE defeito menor (BLOM,1973), mas

considera-se um percentual baixo, não inviabilizando o uso desse sêmen para a reprodução induzida.

No sêmen dos peixes induzidos, as anomalias com maior frequência de ocorrência foram peça intermediária degenerada, considerada defeito maior e flagelo enrolado (defeito menor) (BLOM, 1973). Não sendo observada a ocorrência de cabeça degenerada neste tratamento. Dessa forma, pode se supor que o indutor hormonal possa ter contribuído para a melhora na qualidade das células espermáticas. Embora não influenciando diretamente na gametogênese, como observado neste estudo por meio de concentração espermática semelhante entre os tratamentos.

O volume seminal aumentou significativamente com indução hormonal como já visto em diversos estudos (MACIEL, 2015; PINHEIRO et al., 2016; TSUNEDA et al., 2015), porém isso não resulta também no aumento da quantidade de células espermáticas (CARVALHO, 2016). Além da maturação tardia dos gametas, isso ocorre pela estimulação promovida pelo hormônio para uma maior hidratação testicular o que acarreta em uma maior produção de fluido seminal (PINHEIRO et al., 2016), como já visto em alguns estudos (ALMEIDA, 2013; JÚNIOR, 2017; RICARDO; GUERREIRO, 2015) .

No presente estudo, foi confirmado o mencionado na literatura (STREITJR et al., 2008) a relação da concentração espermática no sêmen coletado atestou que o aumento de volume do sêmen ocorre apenas pelo aumento do plasma seminal, devido a indução à espermição que esse hormônio realiza, não influenciando na espermatogênese, sendo um processo mais tardio (LENZ et al., 2018).

Além disso, a indução hormonal não prejudicou os demais parâmetros, sendo mantida a boa qualidade do sêmen de peixes induzidos assim como a dos não

induzidos, quanto aos parâmetros taxa de motilidade espermática, duração de motilidade e integridade de membrana plasmática. O uso de indutor hormonal não apenas contribui como estímulo para a reprodução dos peixes que criados *ex situ* (CARVALHO, 2016), possibilitando a maturação final do ovócito (SILVA, 2015); a sincronização da reprodução *ex situ* (ARIKI, 2019) como, o aumento do plasma seminal (SOUZA et al., 2018).

Este é o primeiro estudo a quantificar a concentração espermática e o volume do sêmen de *Hypancistrus zebra* sob a influência da ação de indutor hormonal. Podendo servir de base para a melhoria de estudos de reprodução *ex situ* e aprimoramento em tecnologias para reprodução artificial e posteriormente, para a contribuição no processo de conservação desta espécie.

5. CONCLUSÃO

O indutor hormonal pode melhorar alguns parâmetros da qualidade do sêmen de *Hypancistrus zebra*, tais como vigor espermático, morfologia normal e volume seminal, aumentando o mesmo sem alterar a concentração espermática.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P. B. Life history patterns in marine fishes and their consequences for fisheries management. *Fish. Bull.*, v. 78, n. 1, p. 1–12, 1980.
- ALMEIDA, F. L. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 37, n. 2, p. 174–180, 2013.
- ANDRADE-TALMELLI, E. F. DE; KAVAMOTO, E. T.; FENERICH-VERANI, N. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (STEINDACHNER, 1876), após estimulação hormonal *. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 27, n. 2, p. 149–154, 2001.
- ARIKI, D. G. F. Protocolos de indução hormonal com extrato bruto de hipófises de carpa e o perfil da prostaglandina F2 α durante a maturação final e ovulação em *Astyanax altiparanae*. Universidade Estadual Paulista –, 2019.
- ARMBRUSTER, J.; LUJAN, N. K.; TAPHORN, D. C. Four new *Hypancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from Amazonas, Venezuela. *Copeia*, n. 1, p. 62–79, 2007.
- ARRUDA, R. P. DE; CELEGHINI, E.C.C.; GARCIA, A.R.; SANTOS, G.C.; LEITE, T.G.; OLIVEIRA, L.Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M.P. Morfologia espermática de touros : interpretação e impacto na fertilidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 39, p. 47–60, 2015.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Vet. Med.*, v. 25, p. 383–339, 1973.
- CALDAS, J. S. Caracterização seminal do acari zebra imperial *Hypancistrus zebra* Isbrücker e Nijssen, 1991 (Siluriformes: Loricariidae) e protocolos de criopreservação para conservação in vitro. UNiversidade Nilton Lins, 2018.
- CALDAS, J. S.; GODOY, L. Sperm characterization of the endangered Amazonian fish *Hypancistrus zebra*: Basic knowledge for reproduction and conservation strategies. *Animal Reproduction Science*, v. 204, p. 117–124, 2019.
- CAMARGO, M.; GIARRIZZO, T.; ISAAC, V. Review of the geographic distribution of fish fauna of the Xingu river basin, Brazil. *Ecotropica*, v. 10, p. 123–147, 2004.
- CARDOSO, A. L.; CARVALHO, H.L.S.; BENATHAR, T.C.M.; SERRÃO, S.M.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C.; SOUSA, L.M.; READY, J.S.; NORONHA, R.C. Integrated cytogenetic and mitochondrial dna analyses indicate that two different phenotypes of *Hypancistrus* (L066 and L333) belong to the same species. *Zebrafish*, v. 13, n. 3, p. 8 p., 2016.
- CARVALHO, H. R. Status da reprodução de espécies nativas de peixes do Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.
- CRAMER, C. A.; SOUSA, L. M. DE. A new species of tiger pleco *Panaqolus*

(Siluriformes: Loricariidae) from the Xingu Basin, Brazil. PLoS ONE, v. 11, p. 19 p., 2016.

CRUZ, N. O. DA. Altas temperaturas reduzem a agressividade e estimulam o comportamento reprodutivo em *Hypancistrus zebra*. Universidade Nilton Lins/ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2017.

DA SILVA OLIVEIRA, A. F. Análise do potencial efeito da utilização do plasma seminal sintético na inseminação artificial da porca reprodutora. 2016.

EMBRAPA. Manual de Curadores de Germoplasma – Animal: Conservação. 2012

FILHO, E. Z.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 31, n. 3, p. 367–373, 2007.

FILHO, V. A. D.; SANTANA, S.S.; CAVALCANTE, S.S.; NASCIMENTO, A.L.C.; FUJIMOTO, R.Y.; AZEVEDO, H.C.; CARNEIRO, P.C.F.; MARIA, A.N. Protocolo para congelamento e descongelamento do sêmen de tambaqui em macropalhetas. V Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 150–160, 2015.

FUJIMOTO, R. Y. RAMOS, F.M.; TORRES, M.F.; CARNEIRO, P.F.. Abrigos para Criação do Acari Zebra, *Hypancistrus zebra*, em Cativeiro. Comunicado Técnico-EMBRAPA, p. 1–9, 2014.

HANCOCK, J. L. The morphology of boar spermatozoa. Journal. Royal Microscopical Society (Great Britain), v. 76, n. 3, p. 84–97, 1957.

ICMBIO. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. 1. ed. 2018.

JÚNIOR, J. J. B.; BOMBARDELLI, R. A.; NUÑER, A. P. DE O. Gonadorelin increases semen production and does not affect its quality in *Leporinus obtusidens*. Animal Reproduction Science, v. 185, n. August, p. 154–160, 2017.

JÚNIOR, P. A. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE REPRODUTORES DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum* (CUVIER 1818). Universidade Federal Do Amazonas, 2017.

LENZ, D. R.; ANDRÉ, M.V.; LIMA, M.C.C.; PRADO, T.F.; DE PAULA, F.G.; MEIRINHOS, M.L.G.; ARNHOLD, E. Caracterização do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante período reprodutivo. Revista de Ciências Agroveterinárias, v. 17, n. 4, p. 603–607, 2018.

LIMA, P. A. DE. Influência da construção da usina hidrelétrica de Santo Antônio sobre a passagem de larvas e juvenis de pimelodidae, de montante a jusante da barragem no rio madeira, porto velho- ro, Brasil. Fundação Universidade Federal De Rondônia, 2015.

LOPES, J. T.; NUNES, L.T.; ALMEIDA, P.S.; NASCIMENTO, R.V.; CAMPELLO, C.C; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Avaliação de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis*. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 38, n. 3, p. 170–175, 2015.

MACIEL, M. A. P. M. Cinética espermática, criopreservação do sêmen e composição bioquímica do plasma seminal de diferentes espécies de peixes characiformes. Universidade Estadual Do Ceará, 2015.

MAGALHÃES, M. G. P. Descrição da biodiversidade molecular de *Hypancistrus zebra* (loricariidae : siluriformes), uma espécie de peixe ornamental ameaçada de extinção. Instituto Oswaldo Cruz, 2018.

MAGALHÃES, M. G. P.; MOREIRA, D.A.; FURTADO, C.; PARENTE, T.E. The mitochondrial genome of *Hypancistrus zebra* (Isbrücker & Nijssen, 1991) (Siluriformes: Loricariidae), an endangered ornamental fish from the Brazilian Amazon. Conservation Genetics Resources, v. 9, n. 2, p. 319–324, 2017.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H.C., SANTOS, J.P.S., CARNEIRO, P.C.. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. Zygote, v. 20, n. 1, p. 39–43, 2011.

MYLONAS, C. C.; DUNCAN, N. J.; ASTURIANO, J. F. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. Aquaculture, v. 472, p. 21–44, 2017.

PASSINI, G.; CARVALHO, C.V.A.; COSTA, W.M.; CERQUEIRA, V.R. Indução hormonal da desova da carapeva *Eugerres brasilianus* em cativeiro. Boletim do Instituto de Pesca, v. 39, n. 4, p. 433–438, 2013.

PAULINO, M. S.; MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; LIMA, F.S.M.; FELIZARDO, V.O. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de buserelina. Boletim do Instituto de Pesca, v. 37, n. 1, p. 39–45, 2011.

PEREIRA, D. A. S. Viabilidade econômica da produção do cascudo-zebra *Hypancistrus zebra* Isbrücker e Nijssen, 1991 em sistema de recirculação. Programa De Pós-Graduação Em Aquicultura E Pesca Viabilidade, 2018.

PINHEIRO, J. P. S.; LEITE-CASTRO, L.V.O.; LINHARES, F.R.A.; LOPES, J.T.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Qualidade do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) criopreservado em diferentes concentrações de gema de ovo. Ciência Animal Brasileira, v. 17, p. 267–273, 2016.

RAMOS, F. M. Peixes ornamentais do rio Xingu: Manutenção e reprodução do acari zebra *Hypancistrus zebra* Isbrücker & Nijssen, 1991 (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) em cativeiro. Universidade Federal Do Pará, 2016.

RICARDO, L.; GUERREIRO, J. Rastreabilidade na gestão de plantéis de reprodutores de peixes reofílicos : estudo de caso. p. 35–52, 2015.

SAWAKUCHI, A. O.; HARTMANN, G. A.; SAWAKUCHI, H. O.; PUPIM, F. N.; BERTASSOLI, D. J.; PARRA, M.; ANTINAO, J. L.; SOUSA, L. M.; SABAJ PÉREZ, M. H.; OLIVEIRA, P. E.; SANTOS, R. A.; SAVIAN, J. F.; GROHMANN, C. H.; MEDEIROS, V. B.; MCGLUE, M. M.; BICUDO, D. C.; FAUSTINO, S. B. The Volta Grande do Xingu: Reconstruction of past environments and forecasting of future scenarios of a unique Amazonian fluvial landscape. *Scientific Drilling*, v. 20, p. 21–32, 2015.

SILVA, L. A. Maturação e fertilização in vitro de oócitos estágio iii de zebrafish. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, 2015.

SOARES, F. A. C.; Parâmetros qualitativos do sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) no inverno e na primavera R. bras. Ci. Vet., v. 17, n. 3/4, p. 129–133, 2010.

SOUSA, F. B. DE. Aspectos da reprodução induzida do acari pão *Hypancistrus* sp. “I- 333” (siluriformes: loricariidae) em cativeiro. Universidade Federal Rural Da Amazônia - UFRA, 2015.

SOUZA, U. N.; FELIZARDO, V. O.; MELO, C. C. V.; REIS NETO, R. V.; MACHADO, M R. F.; FREITAS, R.T.F. Efeito de aplicação do hormônio hcg em machos de diferentes variedades de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus*. *Boletim de Indústria Animal*, v. 75, p. 1–8, 2018.

STREIT JR, D. P.; RIBEIRO, R.P; MORAES, G.V; MENDEZ, L.V.; GALLO, J.M.; DIGMAYER, M.; POVH, J.A. características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. *Journal of Biosciences*, v. 22, n. 3, p. 119–125, 2006.

STREIT JR, D. P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; CAÇADOR, W.C.; SAKAGUTI, E. S.; POVH, J.A.; SOUZA, E.D. Estudo comparativo da indução hormonal da espermiacção em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 25, n. 2, 2003.

STREIT JR, D. P.; SIROL, RN.; RIBEIRO, RP.; MORAES, G.V.; VARGAS, L.D.M.; WATANABE, AL. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 34, n. 3, p. 337–344, 2008.

TSUNEDA, P. P.; DUARTE, M.F.; SILVA, L.E.S.; JORGE, A.A.; HATAMOTO-ZERVOUDAKIS, L.K.; PAZ, R.C.R. Análise seminal e padronização da coloração eosina-nigrosina em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 22, n. 3–4, p. 198–201, 2015.

VAZZOLER, A. E. A. . Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.

1 edição ed. 1996.

VIVEIROS, A. T. M. Effects of extenders , cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology*, v. 78, n. 2, p. 361–368, 2012.

WINEMILLER, K. . Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. *Oecologia*, v. 81, p. 225–241, 1989.

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGAETNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 31, n. 3, p. 367–373, 2007.