



Inducción a la maduración final y ovulación del yamú *Brycon amazonicus* con EPC y mGnRH-a

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarias

Sandra C Pardo-Carrasco¹ MVZ, MS; José A Arias-Castellanos³ Biol. PhD; Héctor Suárez-Mahecha¹ MVZ, MS; Pablo E Cruz-Casallas³, MVZ, PhD; Wálter Vásquez-Torres³, Biol. PhD; Víctor Atencio-García¹ Ing. Pesq., MS; Evoy Zaniboni-Filho² Ocean. PhD.

¹ Centro de Investigación Piscícola, Departamento de Ciencias Acuícolas, FMVZ, Universidad de Córdoba, Kra 6 N° 67-103, Montería, Colombia.

² Departamento de Acuicultura, Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.
³ Instituto de Acuicultura, Universidad de los Llanos, A.A. 110, Villavicencio, Colombia.
shanyip@terra.com.br

(Recibido: 11 abril, 2005; aceptado: 23 enero, 2006)

Resumen

En hembras de yamú Brycon amazonicus de primera maduración sexual (2 años de edad), con un peso corporal (PC) de 1.500 ± 1 g y longitud total (LT) de 42.6 ± 0.1 cm, fueron probados dos inductores hormonales, extracto de pituitaria de carpa (EPC) y análogo de mamífero de la hormona liberadora de gonadotropinas (mGnRH-a). Ocho tratamientos fueron realizados: seis con mGnRH-a (10, 15 y 20 µg/kg en una sola aplicación y 10, 15 y 20 µg/kg en dos aplicaciones del 10 y 90%, respectivamente), una con EPC (5.5 mg/kg en dos aplicaciones, 10% y 90%, con un intervalo de 12 horas) y un control (solución salina 0.9%). Las hembras inducidas con mGnRH-a y las hembras control no desovaron. El 83.3% de las hembras inducidas con EPC desovaron a las 6.7 ± 0.14 h a 26.9 ± 0.18 °C (temperatura del agua), con un promedio de 117.6 ± 6.8 g de huevos por hembra y 1469.6 ± 34.1 huevos por gramo. La tasa de fertilidad presentó un promedio de $55.3 \pm 6.1\%$ seis horas después de la fertilización (HDF) y $51 \pm 5.8\%$ de sobrevivencia embrionaria a 10 HDF. La eclosión sucedió a las 12 HDF. Solamente las hembras inducidas con EPC presentaron un crecimiento significativo del diámetro ovocitario ($p < 0.05$) de 1086 a 1178 µm.

Palabras clave: *Bryconinae, cultivo, reproducción.*

Introducción

De las más de 40 especies del género *Brycon*, se destaca por su potencialidad para la piscicultura continental del neotrópico (28) el yamú *Brycon amazonicus* (Spix y Agassiz, 1829), cuyo sinónimo más conocido es *B. siebenthalae* (Eigenmann, 1912) (15). Sobresale por su rápido crecimiento, hábito alimenticio omnívoro y características sensoriales excelentes (2,17). Es un pez reofílico, nativo de la cuenca del río Orinoco, que no se reproduce espontáneamente en cautiverio y que gracias a las ventajas anteriormente descritas, los piscicultores lo producen con fines industriales.

Algunos métodos para mejorar las técnicas de inducción a la reproducción y de producción de semilla de yamú han sido desarrollados (19) con el objetivo de suministrar alevinos en forma estable para su cultivo, un asunto vital para la consolidación de la especie en la acuicultura industrial (3).

Evaluar diferentes inductores, buscando mejorar el desempeño reproductivo y disminuir los costos, es importante cuando se trata de optimizar las técnicas reproductivas hormonales. La hipofización, considerada como la primera generación de inductores para el desove, ha sido muy usada desde 1930 (5). Sin embargo, el extracto de hipófisis de

carpa (EPC), presenta algunas desventajas como su alto costo (31), variabilidad en la calidad y cantidad de hormonas presentes (14) especialmente en el contenido de gonadotropinas (GtH), contenido adicional de otras hormonas y la posibilidad de transmitir enfermedades (33). De acuerdo con Donaldson (5), las tecnologías de la tercera generación involucran el uso de análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH-a) con o sin antagonistas de dopamina como el domperidone, el pimozide y la metaclorpramida, en sus muchas formas de aplicación. Zohar y Mylonas (34) mencionaron que por lo menos tres ventajas han sido identificadas para el uso de GnRH-a en la inducción de la reproducción. Primero, es una molécula pequeña de 10 aminoácidos que no genera respuesta inmunológica. Segundo, se induce la liberación de GtH endógeno y se desencadenan desde un nivel superior los procesos de maduración final, ovulación, desove y espermiación, proporcionando una mejor integración de las hormonas necesarias para la reproducción. Tercero, debido a su simplicidad es una molécula que puede sintetizarse en laboratorio, evitando el riesgo de transmisión de enfermedades.

Estudios recientes han determinaron la presencia de más de una forma de GnRH en el cerebro de los peces (23, 29) con varias funciones y potencialidades, generando hipótesis para explicar las variables eficiencias de cada tipo de GnRH en los peces.

De otra parte, determinar el estado de maduración sexual es importante para decidir someter a los peces a inducción hormonal. Características como el diámetro ovocitario, la posición de la vesícula germinal y el factor de condición relativa (Kn), pueden ayudar a reconocer las hembras listas para inducción. Varios autores concuerdan que en miembros de la familia Serrasalminidae (*Piaractus mesopotamicus*) y algunos de la Bryconidae (*Brycon cephalus*), aparecen como características de madurez las siguientes: la distribución del diámetro ovocitario podría ser unimodal y superior a cierto tamaño de acuerdo con la especie (27), la vesícula germinal podría estar en posición central o migrando hacia la periferia (8) y para *Brycon insignis*, el Kn podría ser superior a 1 (1).

Los objetivos del presente estudio fueron determinar los parámetros reproductivos de las hembras de yamú y comparar el efecto de dos inductores hormonales, el EPC y diferentes dosis y protocolos de mGnRH-a en la inducción a la ovulación y al desove.

Materiales y métodos

En el Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos localizado en Villavicencio, Colombia a una latitud 4° 05 ' N, longitud 73° 37 ' O, y una altitud de 420 m, ejemplares de yamú fueron obtenidos por inducción hormonal con EPC de individuos capturados en el río Meta. Durante el segundo año de vida, los futuros reproductores fueron manipulados mensualmente buscando un cierto grado de "domesticación". Fueron mantenidos en estanques de tierra a una densidad de 300 g/m², alimentados con una ración del 30% de proteína bruta y 3000 kcal. A los dos años de edad alcanzaron la madurez sexual, con un PC 1.5 ± 0.001 kg y LT 42.6 ± 0.1 cm. Fueron seleccionados inicialmente de acuerdo con características externas de maduración sexual como abdomen suave, papila genital rojiza y mediante biopsia ovárica se verificó el estado de maduración. Los reproductores se distribuyeron completamente al azar entre los tratamientos. La temperatura, la humedad relativa y la precipitación durante el tiempo de los experimentos fue de 26.4 °C, 84.5% y 516.1 mm respectivamente. Los parámetros físico químicos del agua presentaron pequeña variación, con valores promedios de 27.6 ± 0.1 °C de temperatura, 7.9 ± 0.4 mg/l de oxígeno disuelto y 6.5 ± 0.1 de pH.

Los tratamientos aparecen descritos en la tabla 1. Las hormonas usadas fueron: Extracto de pituitaria de Carpa (EPC) (Argent, USA) y análogo de mamífero del factor liberador de gonadotropinas (mGnRH-a) (D-Ala⁶, des-Gly¹⁰, Sigma Co., St Louis, Missouri) En todos los casos, el diluyente fue solución salina y las aplicaciones se hicieron en la musculatura dorsal.

Tabla 1. Tratamientos hormonales usados para la inducción a la reproducción de Yamú *Brycon amazonicus*

Hormona	n	Protocolo de aplicación		
		Primera Dosis	Intervalo	Segunda dosis
mGnRH-a	6	1 µg/kg	12h	9 µg/kg
mGnRH-a	6	1.5 µg/kg	12h	13.5 µg/kg
mGnRH-a	6	2 µg/kg	12h	18 µg/kg
mGnRH-a	6	—	—	10 µg/kg
mGnRH-a	6	—	—	15 µg/kg
mGnRH-a	6	—	—	20 µg/kg
EPC	6	0.5 mg/kg	12h	5.0 mg/kg
Control	6	Solución Salina	12h	Solución salina

A través del uso de un catéter plástico, se tomaron tres muestras de ovocitos (9) de cada hembra, una al momento de la selección, otra al tiempo de la segunda

dos y la tercera al momento del estrujamiento. A las hembras que no ovularon, la tercera muestra se les tomó dos horas después de ocurrida la ovulación y el desove en las demás. Las muestras fueron preservadas en formol bufferado 3.7% y posteriormente se midieron 100 ovocitos de cada muestra con la ayuda de un estereomicroscopio; el diámetro de los ovocitos fue determinado y la distribución de frecuencia se graficó. En la primera y tercera muestra, se clarificaron submuestras utilizando la solución de Serra (etanol 80%, formol 15%; ácido acético glacial 5%) para determinar la posición de la vesícula germinal (VG). Los estadios de maduración del ovocito fueron clasificados como sigue: vesícula germinal central, migrando, maduro y ovocitos atrésicos en los cuales posteriormente a la adición de la solución de Serra, la vesícula germinal no se encontraba visible, la membrana externa estaba arrugada y su forma no era esférica (18).

El factor de condición relativo fue calculado con el propósito de verificar la condición apropiada de las hembras seleccionadas para el tratamiento hormonal, de acuerdo a lo propuesto por Andrade-Talmelli *et al* (1), $Kn = Pt/Pe$ donde Pt corresponde al peso total del animal y Pe al peso esperado por la relación entre peso y longitud total.

Después de la última inyección, la temperatura del agua fue medida cada hora hasta completar los 160 grados hora a partir de la cual se procedió a revisar cada 15 minutos las hembras para determinar el inicio de la ovulación (19, 20). Todos los desoves fueron realizados en seco para medir la cantidad de huevos desovados por hembra y la cantidad de huevos en cada gramo de huevos. La fertilización fue hecha con una mezcla de semen de machos inducidos con EPC (19, 20). Posteriormente los huevos fueron colocados en incubadoras tipo experimental con una capacidad de 1.5 litros dejando tres incubadoras por cada hembra, como lo describen Pardo-Carrasco *et al* (21). Por medio de tres conteos de 100 huevos por incubadora, la tasa de fertilidad fue determinada 6 horas después de la fertilización (HDF) y la tasa de sobrevivencia embrionaria se midió a las 10 HDF en el estado de embrión avanzado (la eclosión ocurrió a las 12 HDF a 27 °C).

Para los parámetros reproductivos, la diferencia entre promedios fue probada usando análisis de varianza convencional ANOVA, seguido de test de Tukey cuando había diferencia ($p < 0.05$). Para los diámetros ovocitarios, la frecuencia de distribución fue analizada. Para lo anterior fue utilizado el software Systac versión 7.0 (Spss Inc, 1997).

Resultados

Las hembras inducidas con mGnRH-a y las del control no desovaron. En hembras inducidas con EPC el porcentaje de desove fue del 83.3%. El tiempo de latencia (horas trascurridas entre la última inyección y la liberación de huevos) fue de 6.7 ± 0.14 h a 26.9 ± 0.18 °C (véase Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros reproductivos de Yamú *Brycon amazonicus* sometidos a hipofización con extracto de pituitaria de carpa (EPC). Los datos son mostrados como media \pm SEM (Error estándar de la media).

Parámetro reproductivo	n	Resultado obtenido	Valor	
			Min	Max
Peso corporal (kg)	6	1.5 ± 0.01	1.2	2.0
Longitud total (cm)	6	42.7 ± 0.1	40.1	46.2
Tiempo de latencia (h)	5	6.7 ± 0.14	6.02	8.05
Peso de huevos (g)	5	117.6 ± 6.8	11.6	175.6
Número de huevos / gramo	5	1468.6 ± 34.3	1102	1845
Número de huevos / kg hembra	5	$1.2 \times 10^5 \pm 0.07$	0.09×10^5	1.8×10^5
Tasa de fertilidad (%)	5	55.3 ± 6.1	0.0	96.8
Sobrevivencia embrionaria (%)	5	51 ± 5.8	0.0	94
Kn^*	6	1 ± 0.006	0.87	1.12

* Factor de condición relativa (Kn) = Pt/Pe donde Pt corresponde al peso total del animal y Pe al peso esperado por la relación entre peso y longitud total.

El diámetro ovocitario inicial para todas las hembras tuvo una distribución unimodal, la cual osciló entre 1000 y 1125 μ m, con un valor mínimo de 800 μ m y un máximo de 1450 μ m sin diferencia significativa entre hembras ($p > 0.05$). Solamente las hembras tratadas con EPC presentaron un crecimiento significativo del diámetro ovocitario entre las tres muestras tomadas ($p < 0.05$) de 1086 a 1178 μ m, presentando una moda de 1250 μ m, el valor mínimo de 1000 μ m y máximo de 1450 μ m (véase Figura 1).

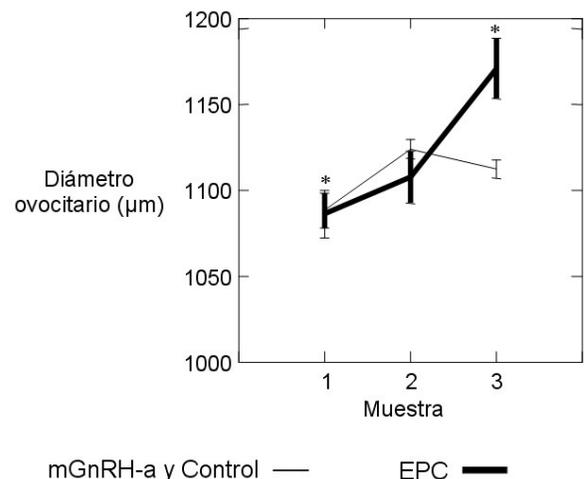


Figura 1. Diámetro promedio de ovocitos de Yamú *Brycon amazonicus* tratados con EPC, mGnRH-a y solución salina (grupo control). Los datos son mostrados como media \pm SEM.* Diferencias significativas entre muestreos ($p < 0.05$).

La vesícula germinal al comienzo del experimento fue encontrada con $7.54 \pm 1.2\%$ en estado central; $80.2 \pm 1.7\%$ migrando; $7.66 \pm 0.9\%$ maduro y $4.62 \pm 1.1\%$ en estado atrésico sin presentar diferencias entre los tratamientos. Al final del experimento, las hembras tratadas con EPC presentaron progreso en la migración de la vesícula germinal con $6.2 \pm 3.2\%$ en estado migrando, $74.9 \pm 5.3\%$ maduro y $18.85 \pm 4.9\%$ en estado atrésico, a diferencia de las hembras inducidas con mGnRH-a y de las control que no presentaron signos de avance en la maduración final ($p < 0.05$) (véase Figura 2). La mortalidad postinducción de los reproductores fue del 10%.

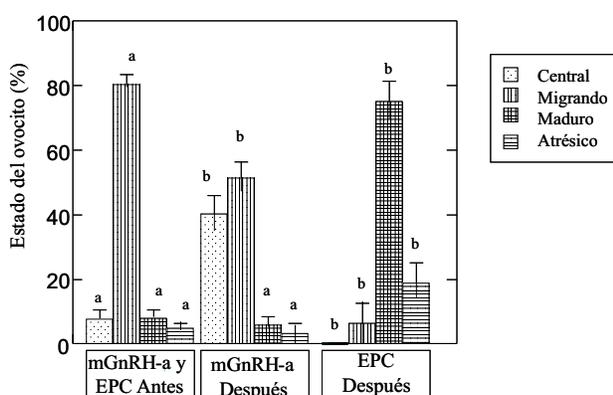


Figura 2. Progreso de la maduración final del yamú *Brycon amazonicus* tratados con EPC, mGnRH-a, y solución salina (control). El primer grupo de barras corresponde a todas las hembras antes de los tratamientos; el segundo grupo de barras a las hembras inducidas con mGnRH-a y al grupo control después del tratamiento, el tercer grupo de barras corresponde a las hembras inducidas con EPC después de su aplicación. Letras diferentes entre los diferentes grupos de barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Discusión

Los parámetros reproductivos de las hembras concuerdan con lo reportado en investigaciones previas de los autores (19), se presenta un porcentaje de éxito levemente mejor para las hembras inducidas con EPC, lo cual indica que nuevos experimentos deben ser conducidos a fin de mejorar este índice. Sin embargo, Lam (14) menciona las desventajas de la hipofización, los extractos de pituitaria son impuros produciendo una acción inesperada, creando dificultad para alcanzar una respuesta positiva en el 100%. La tasa de mortalidad después de la inducción disminuyó en relación a las investigaciones previas (20%) (19), condición que podría explicarse como resultado de la mayor manipulación de los reproductores y mostrando una cierta adaptación a los procesos en cautiverio.

Resultados negativos en experimentos similares con GnRH en *Brycon* han sido obtenidos por diferentes autores (12, 19, 24) y varios aspectos pueden ser discutidos al respecto. La posibilidad de un efecto del estado de maduración puede ser descartada, todas las hembras fueron seleccionadas en igualdad de condiciones, con diámetros ovocitarios superiores a $1000 \mu\text{m}$ y con el $80.2 \pm 1.7\%$ de los ovocitos con la vesícula germinal migrando hacia la periferia, evidencia que habían iniciado la maduración final. De otra parte, los experimentos fueron realizados entre abril y mayo, meses que hacen parte del período reproductivo del yamú, el cual se extiende de marzo a junio (2). Otros eventos que pudieron tener influencia en la efectividad del mGnRH-a, son el tipo de análogo utilizado de GnRH (16), la vía de aplicación (18) y la combinación de mGnRH-a con un antagonista de la dopamina (22).

En el presente estudio, es probable que la causa de la respuesta negativa sea la ausencia de un bloqueador de los factores inhibidores de la liberación de gonadotropinas (GRIF) como domperidone o metaclopramida, método conocido como LINPE (22). Ramos (25) tuvo éxito usando el método LINPE en *Brycon cephalus*, resaltando que el mGnRH-a con domperidone no fue efectivo a las dosis probadas ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$ en una o dos aplicaciones + $5 \text{mg}/\text{kg}$ a $15 \text{mg}/\text{kg}$, respectivamente), pero cuando lo combinaron con metaclopramida ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$ en una aplicación + 10 ó $20 \text{mg}/\text{kg}$, respectivamente) tuvo acción positiva en la inducción. El Ovaprim® (Laboratorio SYNDELL, Canadá) fue solamente efectivo cuando lo usaron al doble de la dosis recomendada por el fabricante ($1 \text{ml}/\text{kg}$). El trabajo de Ramos (25) muestra que no todas las sustancias usadas para bloquear el GRIF son efectivas en este género de peces y que los efectos son dependientes de las dosis. Otra posibilidad es que el tipo de análogo utilizado no tenga receptores en la pituitaria del yamú. Estudios acerca de las formas moleculares de GnRH presente en el cerebro de los *Brycon* podrían dilucidar estas hipótesis. En el cerebro de *Piaractus mesopotamicus* y *Prochilodus lineatus*, han sido observados tres tipos de GnRH: de pollo (cGnRH-II), de salmón (sGnRH) y de Seabream *Sparus aurata* (sbGnRH) (23, 29); obteniéndose resultados positivos con el uso de mGnRH-a sin bloqueador de GRIF (4, 32, 33). Sin embargo, en otros teleosteos como *Carassius auratus*, *Oncorhynchus masou* (13) y *Clarias garipinus* (11) fueron encontradas solamente dos formas (cGnRH-II y de Catfish *Clarias garipinus cfGnRH* o sGnRH) y en ellos se ha observado que es necesario usar el método LINPE para estimular la maduración final y el desove.

Esta evidencia sugiere la posibilidad que los *Bryconideos* presenten diferencias en relación a otros peces estudiados de América del Sur. Otro hecho, es que la liberación de gonadotropinas esta sujeta a la sensibilidad estacional del sistema GnRH, la cual es modulada por la dopamina, quiere decir esto que dependiendo del estado de maduración sexual, es o no necesario el uso de bloqueadores de GRIF (30).

Varios autores confirman el incremento del diámetro ovocitario al momento de la ovulación después de la inducción hormonal (10, 31). En *B. cephalus* inducidos con EPC, Romagosa (26) encontró un incremento en la frecuencia de ovocitos de mayor tamaño en la tercera muestra, así como sucedió para las hembras tratadas con EPC en el presente estudio. Este hecho evidencia un efecto positivo del EPC, mientras que en las hembras tratados con mGnRH-a no se observó incremento en el diámetro ovocitario y el desove no ocurrió.

El factor de condición relativo (Kn) fue usado por primera vez por Eckmann (7) con *Brycon erythropterus* cf. para determinar hembras maduras. Recientemente Romagosa (26) y Andrade-Talmelli et al. (1) corroboraron su uso en *Brycon insignis*, determinando que valores centralizados alrededor de 1 indican hembras listas para participar en los procesos de inducción hormonal. En el presente

trabajo el Kn osciló entre 0.97 y 1.01, con un promedio de 1.0, clasificando todas las hembras como aptas para la inducción.

En este estudio, fue observado que el EPC estimula el desplazamiento de la vesícula germinal hacia la periferia, similar a la información reportada por Drori et al (6) para *Cyprinus carpio* inducida con el método LINPE y EPC.

En conclusión, bajo las condiciones experimentales mostradas, el mGnRH-a no fue efectivo en la inducción a la ovulación y el desove de yamú *Brycon amazonicus*, mientras que EPC fue efectivo en inducir el 83.3% de las hembras tratadas.

Agradecimientos

Los autores desean expresar sus agradecimientos al Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos - IALL por el acompañamiento del experimento, el suministro de los reproductores y el apoyo de su equipo. La financiación estuvo dada por la Universidad de los Llanos y COLCIENCIAS a través del proyecto «Maduración gonadal, reproducción inducida y alevinaje del yamú *Brycon siebenthalae* (1122-09-267-98).»

Summary

Induction to maturation and ovulation of yamú Brycon amazonicus with CPE and mGnRH-a

In females of yamú Brycon amazonicus of first sexual maturation (two years old, body weight (BW) 1.500 ± 1 g and total length (TL) 42.6 ± 0.1 cm), two hormonal inductors were evaluated, carp pituitary extract (CPE) and mammalian gonadotropin-releasing hormone analogue (mGnRH-a). Eight treatments were conducted: six with mGnRH-a (10, 15 and 20 µg/kg BW in single injection and 10, 15 and 20 µg/kg BW in two injections of 10 and 90%, respectively), one with CPE (5.5 mg/kg BW in two applications, 10% and 90%, with an interval of 12 h), and one control (saline solution 0.9%). Females induced with mGnRH-a and females controls did not spawn. The 83.3% of the females induced with CPE spawned at the 6.7 ± 0.14 h at 26.9 ± 0.18 °C (water temperature), with a mean of 117.6 ± 6.8 g per egg volume per female, and 1469.6 ± 34.1 eggs per gram. The fertility rate showed a mean of 55.3 ± 6.1% 6 hours after fertilization (HAF), and 51 ± 5.8% of embryonic survival to 10 HAF. The hatching happened at 12 HAF. Only females induced with CPE presented a significant growth of the diameter (p<0.05) of 1086 to 1178 µm.

Key words: *Bryconinae, culture, reproduction.*

Referências

1. Andrade-Talmelli EF, Fenerich-Verani N, Verani JR. Fator de condição relativo (Kn): um critério para selecionar fêmeas de piabanha *Brycon insignis* (Steindachner, 1876) (Pisces: Bryconidae), para indução reprodutiva. Bol Inst de Pesca 1999; 25: 95-99.
2. Arias CJA. Contribución al conocimiento biológico de los peces de los Llanos, yamú (*Brycon siebenthalae*), y la sapuara (*Semaprochilodus laticeps* cf.) con fines de cultivo. Informe final. Unillanos-Colciencias. Villavicencio. 1995. 63p.
3. Atencio-García VJ, Zaniboni-Filho E, Pardo-Carrasco SC e Arias-Castellanos, A. Influência da primeira alimentação na larvicultura e alevinagem do yamú *Brycon siebenthalae* (Characidae). Acta Scientiarum 2003; 25: 61-72.
4. Carolsfeld J, Ramos SM, Ormanezi R, Gomes JH, Barbosa JM, et al. Analysis of protocols for application of an LHRH analog for induced final maturation and ovulation of female pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887). Aquacult. 1988; 74: 49-55.
5. Donaldson EM. Manipulation of reproduction in farmed fish. Anim Reprod Sci. 1996; 42: 381-392.
6. Drori S, Ofir M, Levavi-Sivan B, Yaron Z. Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide: analyses of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature. Aquacult. 1994; 119: 393-407.
7. Eckmann RT. Induced reproduction in *Brycon* cf. *erythropterus*. Aquacult. 1984; 38: 379-382.
8. Fortuny A, Espinach Ros A, Amutio VG. Hormonal induction of final maturation and ovulation in the sábalo, *Prochilodus platensis* Holmberg: treatments, latency and incubation times and viability of ovules retained in the ovary after ovulation. Aquacult. 1988; 73: 373-381.
9. García LM. Development of an ovarian biopsy technique in the sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). Aquacult. 1989; 77: 97-102.
10. Godinho HP, Godinho AL. Induced spawning of the pacu, *Colossoma mitrei* (Berg 1895), by hypophysation with crude carp pituitary extract. Aquacult. 1986; 55: 69-73.
11. Goos HJTh, Bosma PT, Bogerd J, Tensen CP, Li KW, et al. Gonadotropin-releasing hormones in the African catfish: molecular forms, localization, potency and receptors. Fish Physiol. Biochem. 1997; 17: 45-51.
12. Honczaryk A. Effectiveness of an LHRH analogue for the induced spawning of matrinxã *Brycon cephalus*. In: Proceedings of the Symposium international Biology of tropical fishes, Manaus, Brasil. 1997. p 137.
13. Kobayashi M, Amano M, Kim MH, Yoshiura Y, Sohn YC, et al. Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin in goldfish and masu salmon. Fish Physiol. Biochem. 1997; 17: 1-8.
14. Lam TJ. Environmental influences on gonadal activity in fish. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM. Fish Physiology (IXB), London. Academic Press 1983: 65-101.
15. Lima FCT. Subfamiliy *Bryconinae*: Characins, tetras. In: Reis R, Kullander S, Ferraris JC. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p 174-181.
16. Lin HR, Zhou XJ, Van Der Kraak G, Peter RE. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonists and dopamine antagonists on gonadotropin secretion and ovulation in Chinese loach, *Paramisgurnus dabryanus*. Aquacult. 1991; 95: 139-147.
17. Lugo LM. Determinación de hábitos alimenticios, madurez sexual y desove en tres especies ícticas de la cuenca del río Tomo (Vichada) y consideraciones para el mantenimiento de padrotes; informe final. Villavicencio: Universidad de los Llanos/Colciencias/Cóinco. 1989. 137 p.
18. Mylonas CC, Zohar Y. Induced spawning of wild American shad *Alosa sapidissima* using sustained administration of gonadotropin-releasing hormone analog (GnRHa). J. World Aquac. Soc. 1995; 26 (3): 240-251.
19. Pardo-Carrasco SC, Arias JA, Atencio-García VJ, Zaniboni-Filho E, Vásquez,-Torres W. Ensayos de reproducción inducida del yamú *Brycon siebenthalae* en los llanos colombianos. En: Congreso Sur Americano de Acuicultura. Resumos, Recife. 1998; 282 p.
20. Pardo-Carrasco SC, Arias JA, Atencio-García VJ, Zaniboni-Filho E, Vásquez-Torres W. Experiencias sobre reproducción inducida en el yamú, *Brycon siebenthalae*, en los llanos de Colombia. II Curso Internacional de Acuicultura, Santa fe de Bogotá, DC, Memorias. 1999; p. 24-27.
21. Pardo-Carrasco SC, Suárez-Mahecha H, Zaniboni-Filho E, Arias JA, Atencio-García VJ, et al. Avaliação de incubadoras experimentais para pesquisa em reprodução induzida. En: Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, Florianópolis: Simbraq, 2000, não paginado, CD-ROM.
22. Peter RE, Lin H-R, Van der Kraak G. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. Aquacult. 1988; 74: 1-10.
23. Powell JF, Standen EM, Carolsfeld J, Borella MI, Gazola R, et al. Primary structure of three forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the pacu brain. Regul. Pept. 1994; 68(3): 189-95.
24. Ramos RO, Ramos SM, Medonça JOJ. Utilização de análogos do LHRH, na indução do matrinxã *Brycon cephalus*. B. Tec. CEPTA 1997; 10: 1-7.
25. Ramos SM. Efeito de análogos de LHRH em combinação com receptores antagonistas de dopamine na indução à ovulação do matrinxã, *Brycon cephalus* (Güntherm 1869). Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2000; 48p.

26. Romagosa E. Desenvolvimento gonadal (morfologia; ultra-estrutura) e indução da reprodução do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) em cativeiro Vale do Ribeira, São Paulo. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 1998; 218 p.
27. Romagosa E, De Paiva P, Godinho HM. Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) (*Colossoma mitrei* Berg 1895), induced to spawn. *Aquacult.* 1990; 86: 105-110.
28. Saint-Paul U. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. *Aquacult.* 1986; 54: 205-240.
29. Somoza GM, Stéfano A, D'eraimo JL, Canosa LF, Fridman O. Immunoreactive GnRH suggesting a third form of GnRH in addition to cIIGnRH and s-GnRH in the brain and pituitary gland of *Prochilodus lineatus* (Characiformes) Gen. Comp. *Endocrinol.* 1994; 94: 44-52.
30. Tharakan B, Joy KP. Effects of mammalian gonadotropin-releasing hormone analogue, pimoziide, and the combination on plasma gonadotropin levels in different seasons and induction of ovulation in female catfish. *J. Fish. Biol.* 1996; 48: 623-632.
31. Wallace RA, Selman K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* 1981; 21: 325-343.
32. Zaniboni-Filho E. Utilização do LHRH-a para indução à espermiacão e desova do Pacu-caranha, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Biotemas* 1995; 8 (1): 35-45.
33. Zaniboni-Filho E, Barbosa NDC. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. *Rev. Bras. Biol.* 1996; 56(4): 655-659.
34. Zohar Y, Mylonas C. Endocrine manipulations of spawning in cultures fish: from hormones to genes. *Aquacult.* 2001; 197: 99-136.