

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Ragli Oliveira Azevedo

**USO DO HORMÔNIO HCG NA REPRODUÇÃO NATURAL DE TILÁPIAS DO  
NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Belo Horizonte  
Minas Gerais – Brasil  
2020

Ragli Oliveira Azevedo

**USO DO HORMÔNIO HCG NA REPRODUÇÃO NATURAL DE TILÁPIAS DO  
NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Zootecnia Área de concentração: Produção Animal (Avaliação e/ou simulação de sistemas de produção e reprodução de animais de interesse zootécnico).

Prof. Orientador: Eduardo Maldonado Turra

Belo Horizonte  
Minas Gerais – Brasil  
2020

Azevedo, Ragli Oliveira. 1980.

A994u    Uso do Hormônio HCG na Reprodução Natural de Tilápias do Nilo (*Oreochromis Niloticus*)/ Ragli Oliveira  
Azevedo – 2020.

56p.: il.

Orientador: Eduardo Maldonado Turra

Dissertação de Mestrado apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Tilápias - Teses - 2- Reprodução - Teses – 3- Indução Hormonal - Teses - I- Turra, Eduardo  
Maldonado – II – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III – Título.

**CDD – 636089**

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569



Escola de Veterinária  
UFMG

ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG  
COORDENADORIA GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO E DESEMPENHO  
Av. Antônio Carlos, 6627 - PAVI - CEP: 31275-970 - Belo Horizonte, MG  
11.111.001 - 031 - 3409.2111

www.vet.ufmg.br, ed. e-mail: posgrad@vet.ufmg.br  
E-mail: app@vet.ufmg.br

24/01/20

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE RAGLI OLIVEIRA DE AZEVEDO**

Às 09:00h do dia 28 de fevereiro de 2020, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado na reunião do dia 05/12/2019 para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

Uso do Hormônio PG6 na Reprodução Natural de Fêmeas do Viro (Carcharias taurus), como requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Zootecnia, área de Concentração em Produção Animal. (Aprovado)

final para a obtenção do Grau de Mestre em Zootecnia, área de Concentração em Produção Animal.

Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Eduardo Maldonado Turra, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares de Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Prof. (a)/Dr.(a) <u>Eduardo M. Turra</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. (a)/Dr.(a) <u>Érika Ramos de Albuquerque</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. (a) /Dr. (a) <u>Gabriel Cavalcante Viana</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. (a) /Dr. (a) _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. (a) /Dr. (a) _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a):  Aprovado (a)

Reprovado (a)

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar 08 volumes encadernados da versão final da dissertação, acatando, se houver as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e levou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora e encaminhada juntamente com um exemplar da dissertação apresentada para defesa.

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2020.

Assinatura dos membros da banca:

Eduardo M. Turra  
\_\_\_\_\_  
Gabriel Cavalcante Viana  
\_\_\_\_\_

Érika Ramos de Albuquerque  
\_\_\_\_\_

(Normas Regulamentares da defesa de dissertação no verso)

(Este documento não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador)

Mestrado/Atadefesa.doc

À minha filha, minha amiga, meus familiares e colegas de trabalho por estarem presentes na  
minha caminhada.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador Eduardo Turra agradeço pela orientação e por todos os ensinamentos que contribuíram para meu crescimento acadêmico, por ter sido algumas vezes duro comigo, o que fortaleceu ainda mais minha dedicação.

Agradeço aos professores que compuseram a banca pelo olhar criterioso sobre o trabalho.

A CAPES agradeço pela concessão da bolsa que permitiu minha dedicação integral aos estudos e à pesquisa.

À Prof. Paula por sugerir que eu fizesse o mestrado quando cheguei à UFMG.

Ao Prof. Edgar por reconhecer meu esforço na iniciação científica e fazer seu papel de professor acreditando que eu seria capaz de me tornar uma mestranda.

À Érika por ter sido um exemplo de vida, como bióloga, professora, mulher forte e dedicada à pesquisa.

À Prof. Ângela pelo amor ao ensino da estatística que transformou meu maior temor em aulas agradáveis.

Ao Prof. Leonardo Lara pelas considerações valiosas no meu seminário, que permitiram minha evolução como mestranda.

Ao professor Galileu por permitir minha participação em projetos e trabalhos científicos no setor de ricultura, que propiciaram ampliar meu conhecimento em outra área, ampliando minhas experiências no setor aquícola.

Aos colegas de iniciação científica, graduação e pós-graduação agradeço os diálogos e compartilhamento de informações científicas, nas alegrias e angústias vivenciadas ao longo do processo de pesquisa.

À Maira colega de trabalho na iniciação científica por conversar comigo e comemorar minha aprovação.

Ao Marcão por me ensinar a fazer análise de água muito antes de entrar no Mestrado, e apesar de falar pouco, quando falava eram sábias suas palavras. Gratidão eterna às considerações de correção da minha versão final e sugestões de melhoria após a apresentação.

Ao Ludson por ser tão comunicativo e dedicar uma parte do seu tempo a orientar sobre os mais diversos assuntos científicos e até os do cotidiano.

Ao Vinícius por partilhar sua experiência de mestrado e seu experimento sendo um grande amigo.

Aos colegas de trabalho, Tatiane, Lara, João Pedro, Franklin, Stefani, Thomás e Arthur por trabalharem duro juntamente com toda equipe nas atividades de rotina.

Ao Gabriel por responder minhas perguntas com outras perguntas e me questionar sobre o que eu achava sobre os temas que questionava, assim me incentivou a buscar o conhecimento científico.

Aos meus amigos Adriana, Gean, Maíra, Carol que compartilharam comigo de momentos científicos e breves almoços no Laqua, onde pude crescer como pesquisadora e como pessoa.

À Williane, por ser quem é! Uma mulher forte e exigente que compartilhou comigo desde o primeiro dia momentos diversos. Minha gratidão sem palavras pela correção final do trabalho, me salvar na formatação, sugerindo melhorias, deixando minha versão final mais elaborada.

À Namíbia pela leitura e sugestões finais do trabalho com observações importantes.

Agradeço especialmente à minha filha Paulli por entender as minhas ausências e mesmo assim estar ao meu lado, ser rocha e veludo quando mais precisei.

À minha irmã do coração, Risley, por me ouvir nos momentos mais alegres e me aconselhar nos mais difíceis desta caminhada, me encorajando a sempre seguir em frente de cabeça erguida.

Ao Leonardo, meu companheiro de jornada, por compreensão e tolerância, e mais ainda por compartilhar comigo das ideias e projetos na montagem do nosso sistema aquícola, que possibilitou vivenciar em casa minhas experiências.

Aos meus pais e minha irmã Dita, que sempre estiveram à postos para me ouvir, sorrir, chorar comigo e me apoiaram na jornada. Alimentaram meu corpo e minha alma com sua sabedoria.

A minha querida irmã Greicer (*in memoriam*), exemplo de vida, amor incondicional e dedicação, amiga, mãe, esposa e profissional.... sem palavras. Um ser iluminado na terra. Saudades eternas, sei que está ao meu lado.

Agradeço à Deus por ser meu porto seguro e me fazer sentir a paz que eu precisava em muitos momentos.

“Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma, termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas”.

(Ayrton Senna)



## RESUMO

A sincronização da ovulação ou desova por meio de protocolos hormonais pode permitir um melhor manejo reprodutivo em uma grande diversidade de animais domésticos. Embora a tilápia do Nilo possa reproduzir naturalmente em cativeiro, a produção de ovos pode ser melhorada com a sincronização da desova. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da indução hormonal por hCG na desova natural e artificial da tilápia do Nilo. Para esta avaliação, foram realizados dois experimentos. No primeiro, foram usadas oitenta fêmeas jovens ( $344 \pm 90$  g, aproximadamente 1 ano), quarenta fêmeas velhas ( $565 \pm 152$  g, aproximadamente 3 anos) e 75 machos ( $527 \pm 109$  g, aproximadamente 1 ano). Fêmeas jovens e velhas foram divididas em dois grupos: (1) fêmeas induzidas com hCG na dose de  $3 \text{ UI} / \text{g}^{-1}$  de peso vivo e (2) fêmeas controle que receberam soro, ambos pela via celomática. Avaliou-se três ciclos de reprodução com duração de 7 dias cada, onde cada fêmea recebeu a injeção pouco antes de ser estocada com os machos para reprodução natural em tanques de 5.000 L (8 fêmeas: 5 machos). Após obtermos os resultados do primeiro experimento e com o objetivo de tentar esclarecer as dúvidas surgidas, foi realizado um segundo experimento. Avaliamos diferentes doses (0,5; 1,5; 2,5 e  $3,5 \text{ UI} / \text{g}^{-1}$  fêmea), número de injeções (1 ou 2) e via de administração (celomática ou intramuscular) do hormônio hCG em 40 fêmeas para reprodução artificial por extrusão. Nossos resultados indicam que o uso do hormônio hCG na dose de  $3 \text{ IU} / \text{g}^{-1}$  de peso vivo não é eficaz para a sincronização da reprodução natural em tilápia do Nilo e o efeito negativo da idade sobre o desempenho reprodutivo não foi revertido pelo uso deste hormônio. No segundo ensaio, o desempenho reprodutivo foi claramente superior nas tilápias do Nilo que receberam uma injeção em comparação com aquelas tratadas com duas injeções. Não houve diferença estatística entre as vias de administração avaliadas (celomática ou intramuscular). O uso de uma única injeção com doses menores de hCG (especialmente 0,5 e  $1,5 \text{ IU} / \text{g}^{-1}$  de fêmeas) resultou em 100% de fêmeas desovadas em reprodução artificial e essas doses devem ser investigadas em estudos futuros sobre a sincronização da desova natural em Tilápia do Nilo.

Palavras-chave: Indução hormonal, Reprodução da tilápia, Reprodução natural, Sincronização reprodutiva.

## ABSTRACT

Synchronization of ovulation or spawning by hormonal protocols can allow for better reproductive management in a large diversity of domestic animals. Even though Nile tilapia reproduces naturally in captivity, seed production could benefit from the synchronization of spawning. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of hormonal induction by hCG on the natural and artificial spawning of Nile tilapia. For this evaluation, two experiments were performed. In the first one, eighty young females ( $344 \pm 90$  g, close to 1 year old), forty old females ( $565 \pm 152$  g, close to 3 years old), and 75 males ( $527 \pm 109$  g, close to 1 year) were used. Young and old females were divided into two groups: (1) females induced with hCG at a dose of  $3 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  of live weight and (2) control females that received serum, both by the intracoelomic route. We evaluated three breeding cycles of 7 days long each, where each female received the injection just before being stocked with the males for natural reproduction in 5,000 L tanks (8 females: 5 males). After we obtained the results from the first experiment and intending to try to clarify doubts that arose, a second experiment was carried out. We evaluated different doses (0.5, 1.5, 2.5, and  $3.5 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  female), number of injections (1 or 2), and administration route (intracoelomic or intramuscular) of hCG hormone in 40 females for artificial reproduction by stripping. Our results indicate that the use of hCG hormone in a dose of  $3 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  of live weight is not effective for synchronization of natural reproduction in Nile tilapia and the negative effect of age on reproductive performance was not reversed by the use of this hormone. In the second assay, the reproductive performance was clearly higher in Nile tilapias that received one injection in comparison to those treated with two injections. There was no statistical difference between the administration routes evaluated (intracoelomic or intramuscular). The use of a single injection with lower doses of hCG (especially 0.5 and  $1.5 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  of female) resulted in 100% of spawned females in artificial reproduction and these doses should be investigated in future studies on the synchronization of natural spawning in Nile tilapia.

**Keywords:** hormonal induction, tilapia reproduction, reproduction on-farm, reproductive synchronization.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	15
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	15
<b>3 REVISÃO</b> .....	16
<b>3.1 A tilápia</b> .....	16
<b>3.2 Condições ambientais</b> .....	18
<b>3.3 Manejo reprodutivo</b> .....	19
<b>3.4 Uso de indução hormonal na otimização da reprodução</b> .....	22
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27
<b>5 ARTIGO</b> .....	34
<b>5.1 Introduction</b> .....	36
<b>5.2 Material and methods</b> .....	37
<b>5.2.1 Location, broodstock, and management</b> .....	37
<b>5.2.2 Experiment 1: Use of hCG hormonal induction in natural reproduction</b> .....	37
<b>5.2.3 Experiment 2: Comparisons of doses, administration routes, and number of injections of hCG in assisted reproduction of tilapia</b> .....	38
<b>5.2.4 Statistical Analysis</b> .....	39
<b>5.3 Results</b> .....	40
<b>5.3.1 Experiment 1: Use of hCG for hormonal induction in natural reproduction</b> .....	40
<b>5.3.2 Experiment 2: Comparisons of doses, administration routes and number of injections of hCG in artificial reproduction of tilapia</b> .....	43
<b>5.4 Discussion</b> .....	47
<b>ANEXOS</b> .....	55

## LISTA DE TABELAS

Table 1 – Number of induced females (N), average body weight (g), percentage of spawned females (%), average of larvae production per female (min-max), average of larvae production per gram of female (min-max), average of larvae production per reproduced female (min-max), average of larvae production per gram of reproduced female (min-max) and total production of larvae at the end of three breeding cycles and coefficient of variation (CV), in treatments with the use of hCG or control (serum). .....	41
Table 2 – Number of induced females (N), average body weight (g), percentage of spawned females (%), average of larvae production per female (min-max), average of larvae production per gram of female (min-max), average of larvae production per spawned female (min-max), average of larvae production per gram of spawned female (min-max) and total production of larvae in experiment 1, for the treatments hCG-Y (younger females induced by hCG), hCG-O (older females induced by hCG), Ct-Y (control younger females), Ct-O (control older females). .....	42
Table 3 - Results of fitting the logistic regression model (Model 1) to the reproductive success of Nile tilapia females in natural reproduction. ....	43
Table 4 – Number of females induced (N), average body weight (g), percentage of spawned females (%), average relative fecundity (number of eggs per gram of female), average absolute fecundity (number of eggs per female), average relative and absolute fecundity of spawned females and coefficient of variation (CV) in the dose treatments: (0.5 IU·g <sup>-1</sup> female), 1.5 (1.5 IU ·g <sup>-1</sup> female), 2.5 (2.5 IU·g <sup>-1</sup> female) and 3.5 (3.5 IU·g <sup>-1</sup> female) of hCG. ....	44
Table 5 – Number of females induced (N), average body weight (g), percentage of spawned females (%), average relative fecundity (number of eggs per gram of female), average absolute fecundity (number of eggs per female), average relative and absolute fecundity of spawned females and coefficient of variation (CV) in treatments with 1 (1I) or 2 (2I) injections of hCG. ....	45
Table 6 – Number of females induced (N), average body weight (g), percentage of spawned females (%), average relative fecundity (number of eggs per gram of female), average absolute fecundity (number of eggs per female), average relative and absolute fecundity of spawned females and coefficient of variation (CV) in the treatments with different doses and number of injections of hCG. ....	46
Table 7 - Results of fitting the logistic regression model (Model 2) to the reproductive success of Nile tilapia in assisted reproduction by the use of hCG hormone. ....	47

## LISTA DE ANEXOS

Figura 1- Leitura de chip .....	55
Figura 2 - Tanques de reprodução natural .....	55
Figura 3 - Preparo de injeção de HCG .....	55
Figura 4 - Fêmeas recebendo injeção .....	55
Figura 5- Extrusão de ovos .....	56
Figura 6 - Tilápia com ovos na boca .....	56
Figura 7- Hapas de incubação individual .....	56
Figura 8 - Fêmeas incubando ovos .....	56
Figura 9 - Larvas prontas para contagem .....	56
Figura 10 - Larvas em zoom.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>CPE</b>	Extrato de hipófise de carpa
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>FSH</b>	Hormônio folículo estimulante
<b>GH</b>	Hormônio do crescimento
<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofina
<b>GO</b>	Geração inicial
<b>HCG</b>	Gonadotrofina coriônica humana
<b>ISI</b>	Intervalo Inter desovas
<b>LAQUA</b>	Laboratório de Aquacultura
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>mg</b>	Miligrama
<b>NGTAQUA</b>	Núcleo de estudos em nutrição, genética e tecnologia em Aquacultura da Escola de Veterinária da UFMG
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>TPE</b>	Extrato de hipófise de tilápia do Nilo
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>UI</b>	Unidade internacional

## 1 INTRODUÇÃO

Em 2017 foram apontadas mais de 455 mil unidades de criação de organismos aquáticos em todo o Brasil. Dentre estes organismos, a tilápia lidera em importantes estados produtores aquícolas do país, como o estado do Paraná, com a maior produção nacional (123 mil t), seguido de São Paulo (69,5 mil t.), Santa Catarina (33,8 mil t.), Minas Gerais (31,5 mil t.) e Bahia (24,6 mil t). Estes estados totalizam 70% da produção de toda tilápia nacional (Censo Agropecuário 2017). A espécie de tilápia mais representativa no mercado nacional e mundial é a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Dentre os motivos do aumento de produção e comercialização da tilápia do Nilo é o fato de possuírem carne branca, sem mioespinhas, serem rústicas, apresentar versatilidade alimentar, tolerarem bem o estresse causado por manipulação e ainda serem de fácil reprodução (Santana *et al.*, 2010).

O contínuo crescimento do complexo agroindustrial da tilápia no Brasil e no mundo demanda esforços regulares em todos os seus elos produtivos, inclusive no setor de reprodução e alevinagem. Principalmente, porque há lacunas a serem solucionadas ou aprimoradas entre o fornecimento de formas jovens e a demanda dos agricultores. Historicamente, os larvicultores de tilápia são confrontados com uma série de restrições que limitam o manejo da produção (Little *et al.* 1993; Bhujel, 2000). Estas incluem: quantidade de reprodutores necessários para atender a demanda de alevinos, a idade e o tamanho dos reprodutores, a baixa produção de ovos por desova e a falta de sincronia reprodutiva (Jalabert e Zohar, 1982; Little *et al.*, 1993); todas afetando em algum grau a produção de tilápias.

Uma das tecnologias estudadas desde a década de 30 no Brasil, e que vem contribuindo para o desenvolvimento do setor de reprodução de várias espécies de peixe, é a manipulação do ciclo reprodutivo. Essa manipulação é feita por meio da indução hormonal do animal com a aplicação de substâncias como extratos de hipófise e mais recentemente, análogos de GnRH, em associação ou não com inibidores de dopamina (ex.: domperidona). A principal via de ação desta tecnologia é a estimulação do complexo hipófise/gônadas sexuais dos animais (Andrade e Yasui, 2003). Essas induções químicas possibilitam, para algumas espécies, a efetiva liberação de ovócitos e sêmen (Zaniboni Filho e Weingartner, 2007), além de permitir o aumento da produção e obtenção das células germinativas, antecipando o período reprodutivo, restringindo ou sincronizando a reprodução de lotes de matrizes (Venturieri e Bernardino, 1999).

Existe, contudo, dificuldades em padronizar a técnica de indução hormonal em algumas espécies, especialmente as de desova parcelada como a tilápia. Em tese, esta técnica não seria necessária para este grupo de espécies uma vez que, mesmo em ambiente de produção, estes peixes reproduzem naturalmente o ano todo, se houver condições de qualidade de água adequadas. Contudo, algumas características da espécie como a assincronicidade entre fêmeas demanda a manutenção de grande quantidade de matrizes estocadas para que regularmente haja fêmeas produzindo ovócitos para a fecundação. A possibilidade do uso de indução hormonal com hormônios indutores poderia viabilizar uma maior sincronicidade e liberação de ovócitos em fêmeas sob reprodução com os machos, com consequentemente maior produção de larvas por unidade de matriz e por unidade de produção.

Fernandes *et al.* (2013) demonstraram sucesso no uso de tratamentos com hormônio para induzir desovas em tilápia. No estudo foram testados: extrato de hipófise de carpa (CPE), de hipófise de tilápia do Nilo (TPE), de gonadotrofina coriônica humana (HCG) e de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), em relação à capacidade de induzir maturação e sincronicidade final dos oócitos para coleta de gametas para fertilização *in vitro* de tilápia do Nilo. Entre os tratamentos hormonais analisados, apenas o HCG foi eficaz para produzir gametas viáveis para fertilização *in vitro*.

Porém, é necessário um protocolo que seja viável comercialmente e que possibilite gerar sincronismo de desovas com aumento do número de larvas disponíveis. Tal protocolo permitiria economia com a manutenção do lote de matrizes, mão-de-obra, manteria uma produção regular de larvas e possivelmente evitaria a sazonalidade de fornecimentos de alevinos (Bhujel, 2000), e possibilitaria ao setor reprodutivo dar passos mais largos no seu desenvolvimento.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade do uso de indução hormonal com HCG, no sincronismo de desova das fêmeas em reprodução natural e sua produção de larvas. Assim o aumento do número de larvas disponíveis por reprodução poderá reduzir a quantidade de reprodutores necessários na propriedade, minimizar custos de manutenção, ração e espaço de ocupação de tanques com reprodutores, justificando seu uso na reprodução natural comercial.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o uso de indução hormonal com HCG em matrizes de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) para sincronia de desovas e aumento da produção de larvas em reprodução natural.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar:

- a via de aplicação do hormônio HCG, se celomática ou muscular, a partir dos resultados zootécnicos obtidos;
- as dosagens do hormônio HCG eficazes à indução e liberação de gametas em fêmeas de tilápia do Nilo;
- se a indução hormonal por HCG em dose única ou em duas doses (aplicações) promove diferenças na reprodução de fêmeas de tilápia do Nilo;
- se a interação dos fatores vias, doses e número de doses alteram os resultados obtidos para eficiência reprodutiva de fêmeas de tilápia do Nilo;
- se a idade das fêmeas interfere na produção de larvas quando utilizado a indução em reprodução natural;
- se a aplicação do hormônio HCG na indução de tilápias, quando associado à reprodução natural, pode viabilizar o seu uso comercial.

### 3 REVISÃO

#### 3.1 A tilápia

A tilápia foi introduzida no Brasil em 1972 e abrange várias espécies, incluindo as do gênero *Oreochromis*. São conhecidas mundialmente mais de 70 espécies de tilápia e 22 destas são cultivadas comercialmente (Kubitza, 2009). Ao longo dos anos foram importadas várias linhagens melhoradas geneticamente e realizadas técnicas de seleção de reprodutores que possibilitaram o aumento da produção desta no Brasil.

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, é a espécie mais produzida no Brasil e no mundo (Schulter e Filho, 2017). As principais linhagens desta espécie no Brasil são (1) a tilápia de Bouaké, da Costa do Marfim, África, que chegou no Brasil no ano de 1971 (Wagner *et al.*, 2004); (2) a tilápia Tailandesa ou Chitralada, que foi desenvolvida no Japão e melhorada na Tailândia no Palácio Real de Chitralada (Zimmermann, 2000); (3) a tilápia Supreme, que foi introduzida no Brasil pela empresa (Genomar Supreme Tilápia) após mais de 20 anos de seleção genética (Zimmermann, 2003); e (4) a GIFT (Genetically Improved Farmed Tilapia), introduzida em 2005, produzida nas Filipinas, Tailândia e Malásia, e tem sido alvo de diversos estudos. Possuindo tolerância a variações das condições de cultivo e alta prolificidade, esta espécie tem alta importância comercial (Green *et al.*, 1997), com características apreciadas mundialmente por gerar um pescado de alta qualidade (Zimmermann e Fitzsimmons, 2004).

A tilápia tem sua maturação sexual quando suas gônadas (ovário e testículos) começam a produzir gametas viáveis, por volta do quarto ou quinto mês de idade. Inicia a reprodução a partir do sexto mês e pode acontecer várias vezes ao ano em caso de condições ambientais adequadas (Kubitza, 2000). A desova é parcelada e as fêmeas podem realizar de 8 a 12 desovas anuais. São ovulíparas, ou seja, realizam fecundação e desenvolvimento externo e efetua a desova quando a temperatura da água permanece entre 25°C e 30°C (Philippart e Ruwet, 1982; Popma e Lovshin, 1996). Nessa condição ambiental ótima, a tilápia possui uma reprodução contínua e assincrônica entre as fêmeas de um lote (Gautier *et al.*, 2000).

A fecundidade absoluta (número de ovos por desova) em tilápias aumenta com a idade, porém a fecundidade relativa (número de ovos por unidade de peso de fêmeas) diminui com a idade, peso e comprimento. Fêmeas maiores desovam ovos de maior tamanho (Rana, 1986), contudo fêmeas menores desovam com mais frequência e maior número de ovos (Guerrero e Guerrero, 1985).

No México, pesquisadores observaram que a variação na fecundidade da tilápia do Nilo, medido entre 11 e 12 cm, de 1.505 a 5.559 ovos por desova (Gomez-Marquez *et al.*, 2003), enquanto que, na Nigéria, a fecundidade observada para esta mesma espécie chegou a variar de 73 a 1.810 ovos (Komolafe e Arawomo, 2007). Santos *et al.* (2007) descreveram fêmeas de tilápia nilótica, em primeira desova após a sua maturação sexual, produzindo de 581 a 754 ovos por cada fêmea. Segundo estes dois últimos artigos, quando as condições ambientais de reprodução estão dentro dos parâmetros ideais para a espécie, o tamanho da fêmea é o fator que tem maior influência na fecundidade e o número total de ovos.

Os processos fisiológicos envolvidos na maturação estão relacionados à fatores endócrinos ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e são controlados por estímulos ambientais (Santos *et al.*, 2007). No ciclo reprodutivo da tilápia, a diferenciação das gônadas, gametogênese, liberação de gametas e eclosão dos ovos acontecem em uma cascata de eventos. Esses são controlados por fatores endócrinos encontrados ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas que estimulam e inibem 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 e estimulam as gônadas a sintetizar hormônios esteróides (Amano *et al.*, 2004).

Esses eventos também interagem com outras importantes funções fisiológicas, como nutrição, crescimento (Izquierdo *et al.*, 2001) osmorregulação (Haffray *et al.*, 1995; Le Francois e Blier, 2003) e respostas a fatores de estresse (Schreck *et al.*, 2001). Tecidos e órgãos específicos do sistema sensorial captam e traduzem sinais sazonais em mensagens neuronais ou neuroendócrinas transmitidas ao hipotálamo (Korf, 2006).

O hipotálamo recebe as mensagens neuroendócrinas encaminhadas pelos fotorreceptores extraoculares e essa variação da iluminação promove a liberação de quantidades diferentes da melatonina que determina ao animal o comprimento do dia e a estação do ano. A melatonina apresenta concentrações basais durante o dia e atua diretamente sobre o hipotálamo (Amano *et al.*, 2003).

O sucesso da maturação gonadal de tilápias depende de alguns fatores já citados como: idade, tamanho, mudanças significativas no ambiente, presença do sexo oposto (Gines *et al.*, 2004). Além das técnicas de manejo zootécnico, como taxa de alimentação e densidade animal (Hazard e Eddy, 1951; De Vlaming, 1972; Jalabert e Zohar, 1982; Haddy e Pankhurst, 2000).

Portanto, para atender o crescimento da tilapicultura, torna-se necessário o fornecimento contínuo de ovos, pós-larvas e alevinos em quantidade e qualidade (Bhujel *et al.*, 2001). Para que seja possível esse fornecimento, é importante conhecer os fatores genéticos e ambientais

que irão desempenhar um papel importante no desempenho reprodutivo destes peixes. Os fatores ambientais afetam a liberação do potencial genético (Duponchelle *et al.*, 1997) não sendo diferente em tilápias (Little *et al.*, 1994). Por isto, é necessário monitorar e manter a qualidade da água com parâmetros que favoreçam a apresentação deste potencial.

### 3.2 Condições ambientais

A tilápia é uma das espécies cultivadas que resiste a baixa concentração de oxigênio, variações no pH, altas densidades de estocagem, alta concentração de amônia na água e altas temperaturas (Popma e Phelps, 1998).

As tilápias possuem uma rusticidade natural que permite a sobrevivência em baixos níveis de oxigênio dissolvido, porém os baixos níveis de oxigênio dissolvido ( $< 0,5\text{mg/L}$ ) ao amanhecer em viveiros escavados provocam reduzido crescimento e impactos nas atividades reprodutivas, gametogênese e desova (Chervinski, 1982; Ambali, 1990; Bevis, 1994). Os baixos níveis de oxigênio dissolvido prejudicam o ciclo reprodutivo com consequente atresia do ovócito, inibição da desova, redução da fecundidade e eclosão. Portanto deve-se manter níveis adequados de oxigênio dissolvido (Wedemeyer *et al.*, 1990). A sugestão é manter os animais com níveis acima de  $3,0\text{ mg/L}$  e em tanques com troca de água frequente durante os períodos de reprodução.

Apesar da tolerância da espécie a variações de pH, os níveis de pH inferiores a 4 e superiores a 11, tornam-se letais para tilápia, sendo o melhor nível próximo do neutro a ligeiramente alcalino (Chervinski, 1982; Popma e Lovshin, 1996). Para a reprodução mantêm-se estes parâmetros ainda que não haja estudos que definam valores efetivos.

Tilápias mantidas em altas densidades de estocagem produzem um muco resultante do estresse que inibe a reprodução, assim sugere-se a troca regular de água para auxiliar a remoção desta substância e permitir uma melhora na atividade reprodutiva (Guerrero, 1982).

As tilápias são resistentes à altas concentrações da amônia na água, quando comparada a outras espécies dulcícolas neotropicais. Porém, elevadas concentrações dos compostos nitrogenados: amônia, nitrito e nitrato em sistemas intensivos mal manejados pode causar intoxicação com consequente redução da sobrevivência, crescimento e até a morte dos peixes (Baldisserotto, 2014). Os níveis de amônia elevados podem gerar intoxicação aguda pela amônia, e os principais sintomas incluem: hiperventilação, hiperexcitabilidade, convulsões, perda de equilíbrio, coma e morte (Twitchen e Eddy, 1994). A sugestão é manter a troca de

água para auxiliar a qualidade da água reduzindo a toxicidade da amônia, nitrito e nitrato (Mires, 1982).

A temperatura e o tempo de exposição têm relações significativas com a reprodução. Estudos indicaram que as temperaturas adequadas para reprodução estão acima dos 20°C. Porém, a reprodução em tilápia geralmente é menor entre 21-24°C e aumenta a sua frequência de 25°C a 30°C (Philippart e Ruwet, 1982; Popma e Lovshin, 1996).

Alguns estudos relatam que o fator mais importante aparentemente para a espécie está relacionado à manutenção de temperaturas entre 28 e 31°C, para que este processo ocorra. (Baldisserotto, 2002). Apesar disso Hyder (1970) e Guerrero (1982) demonstraram correlação do desenvolvimento das gônadas e reprodução de tilápias com a duração da luz solar em tanques escavados. Assim também, Ridha e Cruz (2000) demonstraram que a produção de ovos de tilápia é influenciada pela relação da temperatura e fotoperíodo prolongados.

O fotoperíodo age sobre fotorreceptores dos peixes que controla os processos fisiológicos do sistema nervoso central (Yaron *et al.*, 1980; Hansen *et al.*, 2001). Através do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, ocorrem liberação dos hormônios, secreção ovariana de estrogênio e maturação dos órgãos reprodutores. A duração e intensidade luminosa podem atrasar ou acelerar a maturação sexual em peixes. O fotoperíodo em conjunto com nutrição e parâmetros de qualidade de água são influenciadores no crescimento e reprodução das tilápias (Biswas e Takeuchi, 2002). Alterações no fotoperíodo na produção de peixes tem como objetivo produzir formas jovens fora da estação de reprodução, evitando oscilações no fornecimento de alevinos para o mercado. Como relatado para tilápia do Nilo (Hyder, 1970; Ahmed, 2016). Neste contexto, Ahmed (2016) avaliaram tilápias durante seis meses com três fotoperíodos diferentes: fotoperíodo natural 12L:12E (L, Claro; E, Escuro), 18L:6E e 6L:18E. E observaram maior ganho de peso, diâmetro e peso dos ovos, número de espermatozóides e quantidade de testosterona em fotoperíodos mais longos (18L:6E).

Além das condições ambientais de cultivo, fotoperíodo e temperatura, outras variáveis como: tamanho, densidade de estocagem e proporção macho: fêmea são necessárias para otimizar a reprodução das tilápias.

### **3.3 Manejo reprodutivo**

O correto manejo dos reprodutores é necessário para aumentar a produtividade de larvas nos sistemas de aquicultura. Quando as condições ambientais estão adequadas, as tilápias se

reproduzem de forma relativamente simples ao atingirem a maturidade sexual. Realizam numerosas desovas com cuidado parental que proporcionam uma alta sobrevivência das larvas (Arul, 1999).

Porém, apesar de todos os aspectos reprodutivos positivos, os produtores de larvas de tilápia ainda encontram dificuldades para garantir uma produtividade constante. Dentre as dificuldades encontradas estão: o hábito reprodutivo assincrônico e a baixa fecundidade (Little *et al.*, 1993) que estão entre os fatores que afetam a produtividade de ovos e larvas nos diversos sistemas de produção. Esses fatores citados podem ser minimizados mediante um correto manejo das matrizes nos sistemas reprodutivos.

Os manejos nos sistemas reprodutivos que produzem larvas e coleta de larvas de tilápia variam de um lugar para outro, segundo a demanda regional, condições ambientais e fatores econômicos. Existem sistemas tradicionais de coleta de alevinos no próprio tanque de reprodutores, mas este apresenta resultados pouco representativos e indesejáveis, pois pode ocorrer a superpopulação que impede o crescimento (Arul, 1999).

Outros modelos de sistemas mais eficientes e intensivos de produção de larvas incluem: coleta total de pós-larvas, coleta total de pós-larvas em hapas, coleta de ovos diretamente na boca das fêmeas (Beux, 2002).

No sistema de coleta total de pós-larvas os tanques de reprodução são equipados com uma caixa de coleta e facilita captura dos reprodutores e pós-larvas. Após 13 a 21 dias dependendo da temperatura, realiza-se a coleta dos reprodutores e das pós-larvas com a drenagem do tanque. Esse sistema apresenta como vantagem a coleta total com um período curto o que evita o canibalismo entre pós-larvas, porém possui alto gasto de água e necessidade de tanques adicionais para a transferência dos reprodutores (Kubitza, 2000).

Outro sistema intensivo é a coleta total de pós-larvas em hapas. Nesse sistema os reprodutores são estocados em hapas na densidade de 6 peixes por m<sup>2</sup> (Bhujel, 2000) e relação macho: fêmea de 1:2 ou 1:1, que resultam em maior produtividade e são utilizadas em várias unidades de produção de alevinos (Bhujel, 2000). A duração de período reprodutivo é ajustada de acordo com a temperatura da água (Kubitza, 2000). Esse sistema possui como vantagens a coleta mais fácil de pós-larvas, número elevado de pós-larvas recuperados por quilo de fêmea, ovos precoces e tardios mantidos em modesta estrutura de incubação e redução do uso de água, devido à reutilização da água em outros cultivos. Como desvantagem desse sistema estão: a obstrução das malhas pela deposição de algas, problemas com a qualidade de água, aeração no interior dos hapas, maior facilidade de predação por aves e maior risco de roubo.

O último sistema citado é a coleta de ovos diretamente na boca das fêmeas, onde os reprodutores são estocados em hapas de reprodução suspensas dentro de tanques ou viveiros. Os hapas são costurados em malhas de nylon (1-5 a 2 mm) para evitar a perda de ovos e larvas das desovas. Nesse sistema após 5 a 7 dias, os reprodutores são coletados (Beux, 2002). Após a retirada dos reprodutores, existem duas possibilidades: os machos retornam para o tanque estoque e as fêmeas podem incubar os ovos em hapas individuais, ou os ovos podem ser incubados em sistemas artificiais (Campagnolo, 2002).

Para esse tipo de sistema, as vantagens são: possibilitar o aumento da produção de embriões, obtenção de lotes homogêneos com idade conhecida (Little, 1993) e facilitar a coleta das fêmeas para remoção dos ovos (Lovshin e Ibrahim, 1988). E como desvantagens: investimento em infraestrutura de fabricação e manutenção de hapas, uso intensivo de mão-de-obra na coleta, risco com problemas de sanidade no incubatório, que reduziria a taxa de eclosão e sobrevivência das pós-larvas. No caso de manejo com incubação natural pelas fêmeas, há uma melhor taxa de aproveitamento de ovos e sobrevivência das larvas.

Além dos sistemas reprodutivos é importante observar a proporção macho: fêmea e o tamanho e idade dos reprodutores. A proporção de reprodutores influencia diretamente na produção de larvas. Neste contexto, Salama (1996) e Hughes e Behrends (1983) relataram que a proporção 1:2 (macho:fêmeas) apresentou o melhor resultado para produção de larvas. Em outro estudo, Costa-Pierce e Hadikusumah (1995) verificaram que a proporção 1:3 (macho:fêmeas) foi a mais vantajosa. Mires (1982) relata que a proporção de sexo 2:1 é mais produtiva que a proporção de 1:1 e 1:2, possivelmente devido a um aumento na frequência de desova de fêmeas individuais. No entanto, a proporção sexual de 1:1 é usada pela maioria dos incubatórios comerciais (Bhujel, 2000).

O tamanho das fêmeas tem maior relação com a produção de ovos e larvas que a idade (Little, 1989). Este mesmo autor estudou matrizes de tilápia de mesma idade com diferentes pesos (média de 207 g e 267 g), e verificaram que as fêmeas com peso médio de 207 gramas produziram mais larvas quando comparadas com fêmeas de peso médio de 262 gramas.

Algumas espécies de peixes a partir de 60 g podem começar a reproduzir, quando completam o período de maturação sexual que é de aproximadamente 6 meses (Bhujel, 2000). Contudo, de acordo com Moura *et al.* (2011), as matrizes de tilápia não devem superar 300 g, pois além do fator qualidade de larvas e pós-larvas e sua sobrevivência, existe o fator manejo e custos de manutenção destas matrizes durante o ciclo reprodutivo e período de descanso. Logo,

o peso médio de reprodutores de tilápia de 150 a 250 g é o preferido entre os produtores de alevinos (Bhujel, 2000).

### **3.4 Uso de indução hormonal na otimização da reprodução**

O uso de hormônios como indutores de desovas foi inicialmente estudado para peixes reofílicos. Foram testados vários tipos de hormônios e preparações hormonais para adiantar o período de desova, restringir a desova quando necessário, ou mesmo maximizar tempo e recursos, permitir maior rotatividade dos tanques de alevinagem. Pode-se ainda ampliar os períodos em que os peixes estão aptos a reprodução quando as condições ambientais são ideais, disponibilizando maior número de formas jovens ao longo do ano. No mercado existem diversas técnicas e preparações de aplicações hormonais disponíveis (Venturieri e Bernardino, 1999).

O sucesso da indução hormonal depende de vários fatores, porém compreender as características da espécie, fisiologia reprodutiva e controle endócrino, são essenciais para manipular e adequar a reprodução e o protocolo de indução a ser utilizado (Andrade e Yasui, 2003). Diversos protocolos hormonais e tipos de hormônios, foram testados em diferentes espécies de peixes, em diferentes fases de crescimento e maturação sexual. O sistema neuro-hormonal e o cérebro funcionam de forma a integrar o recebimento e a transmissão de informações que irão liberar determinados hormônios em diferentes órgãos do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

De forma resumida, o hipotálamo recebe o estímulo dos fatores ambientais e secreta o hormônio liberador de gonadotrofina. Este hormônio estimula a hipófise a secretar os hormônios gonadotróficos que irão atuar diretamente nas gônadas. As gônadas secretam os hormônios sexuais e promovem a maturação final e liberação dos gametas. Nos machos, o espermatozoide flagelado é liberado no ducto espermático na fase final da gametogênese após sua hidratação. Nas fêmeas ocorre a maturação final após o período de dormência, quando a vesícula germinativa migra até a desintegração total e os ovócitos hidratados são liberados na desova. Na natureza os fatores ambientais estimulam as alterações fisiológicas e promovem a liberação dos gametas. Porém uma opção para estimular essa liberação em cativeiro é a indução hormonal na fase final de gametogênese, em animais sexualmente maduros (Órfão, 2013).

As manipulações de reprodução podem ser divididas no eixo hipotálamo, hipófise e gônadas. Para estímulo ao nível hipotalâmico, pode-se realizar manipulações das condições do ambiente (fotoperíodo, temperatura, salinidade, etc.), promover stress ou alocar juntos machos e fêmeas (Andrade e Yasui, 2003).



Nas induções químicas ao nível da hipófise, podem ser utilizados análogos de GnRH para estimular a produção e liberação de gonadotrofinas pelas células gonadotrópicas hipofisária, ou o uso de antagonistas de dopamina (domperidona, pimizida, metoclopramida). A dopamina inibe a secreção de gonadotrofinas e, conseqüentemente, o uso dos seus antagonistas aumenta os níveis plasmáticos de gonadotrofinas (Venturieri e Bernardino, 1999).

As induções com as formas de GnRHs (sGnRH, LHRH e LHRHa) atuam indiretamente nas gônadas, induzindo a hipófise na produção intrínseca de gonadotrofinas e tem como vantagens: custo reduzido, menor resposta imune e padronização quantitativa. Porém sua estocagem deve ser sob refrigeração e a metodologia não está definida em muitas espécies. (Andrade e Yasui, 2003). As doses comumente utilizadas são 10 a 15 mg/kg de peixe para fêmeas e 3 a 5 mg/kg de peixe para machos. Outra opção são os antagonistas de dopamina, que bloqueiam o mecanismo de inibição efetuado pela dopamina, e aumentam a produção intrínseca de GnRH. A vantagem desse método é que possui menor resposta imune, e pode ser ministrado conjuntamente com gonadotrofinas de atuação sinérgica. Porém, não possui metodologia de doses e não está bem definida em muitas espécies. A dose utilizada é 5 mg/kg de peixe associado ao GnRH. Peter *et al.* (1988) testaram o GnRHa associado a um antagonista de dopamina em várias espécies de água doce cultivadas na China e encontraram sucesso nas desovas, taxas de incubação e sobrevivência de alevinos.

Para induções ao nível das gônadas, são utilizadas preparações de macerado de hipófises desidratadas, gonadotrofinas de peixes e gonadotrofina coriônica humana (HCG) para estímulo químico diretamente nas gônadas. Nessa opção o fornecimento de gonadotrofinas necessários a maturação final do ovócito em fêmeas e espermiacão em machos permite a extrusão dos gametas (Venturieri e Bernardino, 1999).

O uso de extrato de hipófise intensificou-se no Brasil nas últimas décadas, permitindo aperfeiçoamento da técnica. A utilização de glândulas pituitárias, hormônios e seus análogos para indução da desova em carpas, bagres e salmonídeos foi um grande avanço na aquicultura. Inicialmente foram utilizados triturados de hipófises frescas de peixes doadores obtidos em época de piracema. Com o passar dos anos aprimorou-se a técnica utilizando extrato de hipófise centrifugada a partir de hipófise conservada a seco, após desidratação em acetona (Streit *et al.*, 2002). A carpa, um peixe de desova parcial, foi o principal doador de hipófise para uso experimental e comercial (Pillay, 1990; Streit *et al.*, 2002). Apesar disso, foram testadas hipófises de outras espécies de peixes, como o curimatá (*Prochilodus lineatus*) (Bernardino *et al.*, 1993), anuros (Mustafá *et al.*, 1984; Nwadukwe, 1993) e aves (Amaral Júnior, 1998; Barroso, 1987), induzindo outras espécies de peixes. A maior dificuldade do uso desse método

de hipofização é a padronização de dosagens das espécies doadoras em relação às induzidas, pois existem diferenças espécies-específicas nas respostas (Matty, 1995).

O extrato de hipófise quando associado com LHRHa, em *Acipenser oxyrinchus*, gerou melhor resultado na espermição induzida (Mohler e Fletcher, 1999), e quando associado a HCG na indução de *Abramis brama*, um peixe de água doce comum no leste europeu, resultou em 100% de espermição e 79% de fêmeas ovuladas (Kucharczyk *et al.*, 1997).

A indução com uso de GtHs (HCG, LH) também atuam diretamente nas gônadas induzindo a maturação final, ovulação e espermição dos teleósteos mantidos em cativeiro (Mousa, 2010; Cejko *et al.*, 2012). O HCG é uma glicoproteína obtida através da purificação da urina de mulheres grávidas, quando puro contém aproximadamente 10.000 UI/mg. Possui padrão qualitativo, possibilidade de estocagem por longo período e facilidade de aquisição, mas possui custo elevado. Além disto, por ser obtida através da gonadotrofina humana, o distanciamento filogenético com a gonadotrofina de peixes pode reduzir sua eficácia (Venturieri e Bernardino, 1999) e pode promover reações imune. São diversas as variações de protocolos (dosagens) e resposta dos teleósteos mediante a administração deste hormônio, em decorrência da variação de espécies, tipos de desova (parcelada ou total) e formas de atuação do hormônio no organismo.

De forma geral, a técnica de hipofização é muito utilizada para produção comercial de peixes reofílicos mantidos em cativeiro, pois não se reproduzem naturalmente. Porém a utilização não se restringe aos peixes reofílicos. Foi utilizado em *Tinca tinca* para obtenção de esperma e fertilização artificial de ovócitos coletados, que resultaram em 71,4 % de fertilização (Linhart e Kvasnicka, 1992). Da mesma forma, o uso do hormônio HCG em tilápia tem sido pesquisado com a finalidade de induzir desova com extrusão de gametas e fertilização *in vitro* (Hirose, 1980; Garcia-Abiado *et al.*, 1994; Carrillo e Romagosa, 2004; El-Gamal e El-Greisy, 2005; Valentin, 2007; Owusu-Frimpong, 2008; Fernandes *et al.*, 2013, Souza *et al.*, 2016; Tuzine, 2018). Em programas de melhoramento genético pode ser utilizado para fertilização de gametas de diferentes famílias ao mesmo tempo, possibilitando avaliar um grande número de indivíduos nas mesmas condições (Mylonas, 2010).

Importantes estudos na tentativa de induzir a tilápia tem sofrido modificações ao longo dos anos. Em 1980, Hirose relatou em seus estudos que aplicações repetidas de HCG afetavam os peixes, por causar estresse, o que reduzia a taxa de fertilização e eclosão e piorava a qualidade dos ovos. Outros estudos mencionam que as tilápias não respondem satisfatoriamente à indução hormonal (Rana, 1988; Bhujel, 2000; Shelton, 1998, 2000, 2002).

Garcia-Abiado *et al.* (1994) aplicaram doses únicas de HCG para aumentar as taxas de desova na tilápia do Nilo, utilizando dosagens de 0,5 a 3,5 UI de HCG/g de peixe, por via intramuscular, em fêmeas sexualmente maduras. As dosagens de 2 a 3,5 UI de HCG/g de peixe aumentaram significativamente a porcentagem de desovas das fêmeas. Sendo a melhor dosagem 3,5 UI/g de fêmea, que resultou em 75% fêmeas desovadas. Carrillo e Romagosa (2004) encontraram resposta efetiva para obtenção de ovócitos pela indução de tilápias com HGC em duas doses (5 UI/g de fêmea).

No ano seguinte, El-Gamal e El-Greisy (2005) demonstraram que o HCG combinado com fotoperíodo e temperatura interfere diretamente no desenvolvimento gonadal e na desova. Esses autores encontraram maiores valores do índice gonadossomático e diâmetro dos óvulos em fotoperíodo prolongado associado com maior temperatura com aplicações intramusculares duplas de HCG (25 e 50 UI/g de peso corporal).

Assim também, Valentin (2007) testou indução com HCG (5 UI/g de HCG) em *O. niloticus* e verificou taxas de fertilização e eclosão acima de 50%, considerando satisfatória a resposta no experimento.

Ainda buscando obter oócitos através de extrusão, Owusu-Frimpong (2008) com dose única de injeção intramuscular de HCG a 0,5, 1,0 e 1,5 UI/g, gerou com êxito a desova em tilápia azul *Oreochromis aureus*. Este estudo demonstrou que o tempo de desova foi significativamente melhor entre as fêmeas aplicadas com hormônio em comparação aos controles, e o aumento da concentração hormonal facilitou um maior controle sobre a coleta de gametas e programação da reprodução induzida.

Cinco anos depois, Fernandes *et al.* (2013) testaram diversos tratamentos e tipos de hormônio individualmente: extrato de hipófise de carpa (CPE), extrato de hipófise de tilápia do Nilo (TPE), gonadotrofina coriônica humana (HCG) e hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). O uso de hormônio HCG (entre 1.000 e 5.000 UI/g de peixe) foi eficaz para induzir a maturação final de oócitos em tilápia do Nilo e sua extrusão.

Em 2016, Souza *et al.*, realizaram experimento com variedade GIFT e UFLA em 80 fêmeas com aplicação de HCG com doses de 5 UI/g de fêmea em horários de 12, 18 e 24 horas. A variedade GIFT parece não ser influenciada pela aplicação do hormônio HCG, sendo observada porcentagem semelhante de fêmeas desovadas entre o grupo controle e o grupo induzido independente do horário de aplicação. A indução com HCG apresentou melhores resultados para índice de desova (número de ovócitos liberados em relação ao peso do animal) e peso de desova independente da variedade utilizada.

Em 2018, Tuzine avaliou a sincronização sexual de reprodutores de tilápia do nilo utilizando indução por HCG e diversas combinações de tanques em três tempos (7, 14 e 21 dias). Os animais foram divididos em dois grupos: um grupo recebeu indução intramuscular de 5 UI/g de fêmea e outro grupo soro fisiológico. Os animais foram extrusados por massagem celomática após 667 horas-grau da aplicação do hormônio. Os resultados obtidos aos 21 dias demonstram melhores resultados de desovas para fêmeas induzidas (83,33%) em comparação com fêmeas que receberam soro fisiológico (24,41%).

Vários dos experimentos referenciados utilizaram a indução hormonal com HCG em fêmeas de tilápia com objetivo de obter oócitos para experimentos com reprodução induzida e manipulações cromossômicas, e demonstraram efetividade neste quesito. Até onde se sabe, não existem estudos que utilizam a indução hormonal de HCG na reprodução natural de tilápias com objetivo de melhorar a sincronização de desovas, apenas estudos com uso hormonal para extrusão de gametas e fertilização artificial. Portanto, são necessárias novas pesquisas para a avaliação de doses e vias de aplicação mais efetivas para indução de tilápia na reprodução natural.

## REFERÊNCIAS

- AGROPECUÁRIO, I.C. (2017). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3093/agro\\_2017\\_resultados\\_preliminares.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3093/agro_2017_resultados_preliminares.pdf)
- AHMED, N.H., DAADER, A.H., EI-DARAWANY, A.A., ABDINE, A.M., FARAG, M.E.Z. (2016). Effect of photoperiods manipulation on growth and some reproductive activities of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Zagazig Journal of Agricultural Research*, v.34, p.2037-2050.
- AMANO, M., IIGO, M., IKUTA, K., KITAMURA, S., YAMAMORI, K. (2003). Characterization and maturational differences of melatonin binding sites in the mas salmon brain. *General and Comparative Endocrinology*, v.131, p.338-344.
- AMANO, M., YAMANOME, T., YAMADA, H., OKUZAWA, K., YAMAMORI, K. (2004). Effects of photoperiod on gonadotropin-releasing hormone levels in the brain and pituitary of underyearling male barfin flounder. *Fisheries Science*, v.70, p.812-818.
- AMARAL JÚNIOR, H. (1998). Utilização de extrato hipofisário de galinha *Gallus domesticus*, para indução a desova de tenca *Tinca tinca* (L. 1758). Opção de banco de hipófise para o pequeno produtor rural. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.5, p.134-138.
- AMBALI, A.J.D. (1990). Effect of hapa size on conditioning of broodstock *Oreochromis niloticus* in fertilized earthen ponds. *Asian Institute of Technology*, 101p.
- ANDRADE, D.R., YASUI, G.S. (2003). O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.166-172.
- ARUL, V.S. (1999). Últimos avances en el manejo de reproductores de tilápia. International Director, Aquaculture. Agribands International. EUA: Saint Louis. p.1-7.
- BALDISSEROTTO, B. (2002). Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria: UFSM, 212p.
- BALDISSERTO, B., CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C. (2014). Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal, São Paulo: Ed. FUNEP, 336p.
- BARROSO, R. (1887). Utilização do extrato bruto de hipófise de frango de corte (*Gallus domesticus*) na indução da maturação final oocitária e da desova em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). (Holmberg, 1887). 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.
- BERNARDINO, G., SENHORINI, J.A., FONTES, N.A., BOCK, C.L., MENDONÇA, J.O.J. (1993). Propagação artificial do matrinhã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei, Characidae). *Boletim Técnico CEPTA*, v.6, p.1-9.

- BEUX, L.F. (2002). Avaliação do Desempenho Reprodutivo da Tilápia (*Oreochromis niloticus*) em Sistema de Incubação Artificial. 2002. Trabalho de Conclusão de Curso - Engenharia de Pesca - UNIOESTE - Paraná.
- BEVIS, R. (1994). The effect of artificial nests on reproductive performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) spawned in net hapas. MSc thesis, Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand. 111p.
- BHUJEL, R.C. (2000). A review of strategies for the management of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in seed production systems, especially hapa-based systems. *Aquaculture*, v.181, p.37-59.
- BHUJEL, R.C., TURNER, W.A., YAKUPITIYAGE, A., LITTLE, D.C. (2001). Impacts of environmental manipulation on the reproductive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Aquaculture in the Tropics*, v.16, p.197-209.
- BISWAS, A. K., TAKEUCHI, T. (2002). Effect of different photoperiod cycles on metabolic rate and energy loss of fed and unfed adult tilapia *Oreochromis niloticus*: Part II. *Fisheries science*, v.68, p.543-553.
- CAMPAGNOLO, C. (2002). Sobrevivência de Ovos e Embriões de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) em Sistema de Incubação Artificial. 2002. 18p. Trabalho de Conclusão de Curso - Engenharia de Pesca, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo.
- CARRILLO, M., ROMAGOSA, E. (2004). Efeito do choque térmico quente em ovos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*): tempo pós-fertilização e duração do processo na sobrevivência das larvas. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.31, p.55-64.
- CEJKO, B.I., TARGOŃSKA, K., KOWALSKI, R.K., ŻARSKI, D., SAROSIEK, B., KUCHARCZYK, D., GLOGOWSKI, J. (2012). The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). *Journal of Applied Ichthyology*, v.28, p.873-877.
- CHERVINSKI, J., (1982). Environmental physiology of tilapias, p.119-128. In: Pullin, R.S.V., Lowe-McConnell, R.H. Eds., The biology and culture of tilapias, *ICLARM Conference Proceedings 7*, International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines, 432p.
- COSTA-PIERCE, B.A.Y., HADIKUSUMAH, H. (1995). Production management of double-net tilapia *Oreochromis* spp. hatcheries in a eutrophic tropical reservoir. *Journal of the World Aquaculture Society*, v.26, p.453-459.
- DE VLAMING, V.L. (1972). The role of endocrine system in temperature controlled reproductive cycling in the estuarine gobiid fish, *Gillichthys mirabilis* Comp. *Journal Biochemistry and Physiology*, v.41, p.697-713.
- DUPONCHELLE, F., POUYAUD, L., LEGENDRE, M. (1997). Variation in reproductive characteristics of *Oreochromis niloticus* populations: genetic or environmental effects. In: Fitzsimmons, K. Ed., *Tilapia Aquaculture: Proceedings from the 4<sup>th</sup> International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, NRAES-106, Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY, 808p.

- EL-GAMAL, A.E.E., EL-GREISY, Z.A. (2005). Effect of photoperiod, temperature and HCG on ovarian recrudescence and ability of spawning in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *Egyptian Journal Aquatic Research*, v.31, p.419-431.
- FERNANDES, A.F.A., ALVARENGA, É.R., OLIVEIRA, D.A., ALEIXO, C.G., PRADO, S.A., LUZ, R.K., SACRAMENTO, N.L., TEIXEIRA, E.A., LUZ, M.R., TURRA, E.M. (2013). Production of oocytes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) for in vitro fertilization via hormonal treatments. *Reproduction in Domestic Animals*, v.48, p.1049-1055.
- GARCIA-ABIADO, M.A.R., PASCUAL, L.P., MAIR, G.C. (1994). Use of Human Chorionic Gonadotrophin (HCG) for Induced Spawning in Tilapia Under. *Asian Fisheries Science*, v.7, p.225-231.
- GAUTIER, J.Y., LEFAUCHEUX, B., FORASTE, M., JALABERT, B., BAROILLER, J.F. (2000). Periodicity and duration of the papillary, sexual and behavioral cycle in the tilapia *Oreochromis niloticus*. In *Proceeding from the Fifth International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. Rio de Janeiro, Brasil, 48p.
- GINES, R., AFONSO, J.M., ARGÜELLO, A., ZAMORANO, M.J., LOPEZ, J.L. (2004). The effects of long-day photoperiod on growth, body composition and skin colour in immature gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, v.35, p.1207-1212.
- GOMEZ-MARQUEZ, J.L., PEÑA-MENDOZA, B., SALGADO-UGARTE, I.H., GUZMÁN-ARROYO, M. (2003). Reproductive aspects of *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae) at Coatetelco lake, Morelos, Mexico. *Revista Biología tropical*, v.51, p.221-228.
- GREEN, B.W., VEVERICA, K.L., FITZPATRICK, M.S. (1997). Fry and Fingerling Production. Dynamics of Pond Aquaculture. Edited By Hillary S. Egna, Claude E. Boyd. CRC Press LLC.
- GUERRERO, R.D. III. (1982). Control of tilapia reproduction, p.309-316. In: Pullin, R.S.V., Lowe-McConnell, R.H. Eds: The biology and culture of tilapias, *ICLARM Conference Proceedings 7*, International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines, 432p.
- GUERRERO, R.D. III., GUERRERO, L.A. (1985). Effect of breeder size on fry production of Nile tilapia in concrete pools. *Trans. Natl. Acad. Sci. Technol., Repub. Philipp.* v.7, p.63-66.
- HADDY, J.A. PANKHURST, N.W. (2000). The effects of salinity on reproductive development, plasma steroid levels, fertilization and egg survival in black bream *Acanthopagrus butcheri*. *Aquaculture*, v.188, p.115-131.
- HAFFRAY, P., FOSTIER, A., NORMANT, Y., FAURE, A., LOIR, M., JALABERT, B., MAISSE, G. (1995). Impact of seawater rearing or freshwater transfer on final maturation and on gamete quality in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquatic Living Resources*, v.8, p.135-145.
- HANSEN, T., KARLSEN, Ø., TARANGER, G.L., HEMRE, G.I., HOLM, J.C., KJESBU, O.S. (2001). Growth, gonadal development and spawning time of Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared under different photoperiods. *Aquaculture*, v.203, p.51-67.

- HAZARD, T.P., EDDY, R.E. (1951). Modification of the sexual cycle in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by control of light. *Transactions of the American Fisheries Society*, v.80, p.158-162.
- HIROSE, K. (1980). A bioassay for teleost gonadotropin using the germinal vesicle breakdown (GVBD) of *Oryzias latipes* oocytes in vitro. *General and comparative endocrinology*, v.41, p.108-114.
- HUGHES, D.G., BEHREND, L.L. (1983). Mass production of *Tilapia nilótica* seed in suspended net enclosures. In *Tilapia Aquaculture. Proceedings of the International Symposium on Tilapia Aquaculture*, Israel Tel Aviv University, Nazareth p.394-401).
- HYDER, M. (1970). Gonadal and reproductive patterns in *Tilapia leucosticta* (Teleostei: Cichlidae) in an equatorial lake, Lake Naivasha (Kenya). *Journal of Zoology*, v.162, p.179-195.
- IZQUIERDO, M.S., FERNANDEZ-PALACIOS, H., TACON, A.G.J. (2001). Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, v.197, p.25-42.
- JALABERT, B., ZOHAR, Y. (1982). Reproductive physiology in cichlid fishes, with particular reference to *Tilapia* and *Sarotherodon* (tropical and sub-tropical). In *International Conference on the Biology and Culture of Tilapias*. Bellagio (Italy). p.2-5.
- KOMOLAFE, O.O., ARAWOMO, G.A.O. (2007). Reproductive strategy of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) in Opa reservoir, Ile-Ife, Nigeria. *Revista de Biología Tropical*, v.55, p.595-602.
- KORF, H.M. (2006). The pineal organ. In: Reinecke, M., Zaccone, G., Kapoor, B.G. (eds). *Fish Endocrinology*, v.2. USA: Science Publishers.
- KUBITZA, F. (2000). *TILAPIA, tecnologia e planejamento na produção comercial*, 285p.
- KUBITZA, F. (2009). Produção de tilápias em tanques de terra: estratégias avançadas no manejo. *Panorama da Aquicultura*, v.115, p.14-21.
- KUCHARCZYK, D., KUJAWA, R., LUCZYNSKI, M., GLOGOWSKI, J., BABIAK, I., WYSZOMIRSKA, E. (1997). Induced spawning in bream, *Abramis brama* (L.), using carp and bream pituitary extract and HCG. *Aquaculture Research*, v.28, p.139-144.
- LE FRANÇOIS, N.R., BLIER, P.U. (2003). Reproductive events and associated reduction in the seawater adaptability of brook charr (*Salvelinus fontinalis*): evaluation of gill metabolic adjustments. *Aquatic Living Resources*, v.16, p.69-76.
- LINHART, O., KVASNIŠKA, P. (1992). Artificial insemination in tench, *Tinca tinca* L. *Aquaculture Research*, v.23, p.183-188.
- LITTLE, D.C. (1989). An evaluation of strategies for production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fry suitable for hormonal treatment. PhD. Thesis, Institute of Aquaculture, University of Stirling, UK.
- LITTLE, D.C., MACINTOSH, D.J., EDWARDS, P. (1993). Improving spawning synchrony in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, v.24, p.399-405.



- LITTLE, D.C., SIKAWA, D., JUNTANA, J. (1994). Commercial Production and Marketing of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fry in Chonburi and Chachoengsao Provinces. Thailand. *NAGA. The ICLARM Quarterly*, p.14-17
- LOVSHIN, L. L., & IBRAHIM, H. H. (1988). Effects of broodstock exchange on *Oreochromis niloticus* egg and fry production in net enclosures. In *The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture* (pp. 231-236). Department of Fisheries Bangkok, Thailand,.
- MATTY, A.J. (1995). Hormones and aquaculture. In: STREIT JR, D.P., DE MORAES, G.V., RIBEIRO, R.P., CARDOZO, R.M., MOREIRA, H.L.M. (2002). As Tendências da Utilização do Extrato de Hipófise na Reprodução de Peixes-Revisão. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v.5, p.231-238.
- MIRES, D. (1982). A study of the problems of the mass production of hybrid tilapia fry. p. 317-329. In: Pullin, R.S.V., Lowe-McConnell, R.H. Eds., *The biology and culture of tilapias*. ICLARM Conference Proceedings 7, International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines, 432p.
- MOHLER, J.W., FLETCHER, J.W. (1999). Induced spermiation in wild Atlantic sturgeons held captive up to six years. *North American Journal of Aquaculture*, v.61, p.70-73.
- MOURA, P.S., MOREIRA, R.L., TEIXEIRA, E.G., MOREIRA, A.G., LIMA, F.R.D.S., FARIAS, W.R. (2011). Desenvolvimento larval e influência do peso das fêmeas na fecundidade da tilápia do Nilo. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.6, p.531-537.
- MUSTAFA, S., AHMAD, Z., MURAD, A., ZOFAIR, S.M. (1984). Induced spawning of catfish by frog pituitary gonadotropins. *The Progressive Fish-Culturist*, v, 46, p.43-44.
- MOUSA, M.A. (2010). Induced spawning and embryonic development of *Liza ramada* reared in freshwater ponds. *Animal reproduction science*, v.119, p.115-122.
- MYLONAS, C.C., FOSTIER, A., ZANUY, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and comparative endocrinology*, v.165, v.516-534.
- NWADUKWE, F.O. (1993). Inducing oocyte maturation, ovulation and spawning in the African catfish, *Heterobranchus longifilis* Valenciennes (Pisces: Clariidae), using frog pituitary extract. *Aquaculture Research*, v.24, p.625-630.
- ORFÃO, L.H. (2013). Indução da desova e espermição de peixes em criações comerciais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.37, p.192-195.
- OWUSU-FRIMPONG, M. (2008). Controlled artificial reproduction in mouth brooding Tilapia with human Chorionic Gonadotropin. *Journal of the Ghana Science Association*, v.10, p.70-77
- PETER, R.E., LIN, H.R., VAN DER KRAAK, G. (1988). Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture*, v.74, p.1-10.

- PHILIPPART, J.C., RUWET, J.C. (1982). Ecology and distribution of tilapias. In *The Biology and Culture of Tilapias. ICLARM Conference Proceedings v.7, 432 pages* (pp. 15-59). ICLARM-International Center for Living Aquatic Resources Management. Manila, Philippines, 432p.
- PILLAY, T.V.R. (1990). *Aquaculture: Principle and Practices*. Oxford: Fishing News Books.
- POPMA, T.J., LOVSHIN, L.L. (1996). Worldwide prospects for commercial production of tilapia. Research and development series no. 41, Department of Fisheries and Allied Aquacultures Auburn University, AL, USA, 23p.
- POPMA, T.J., Phelps, R.P. (1998). Status report to commercial tilapia producers on monosex fingerling productions techniques. *Aquicultura Brasil*, v.10, p.127-145.
- RANA, K. J. (1986). Parental influences on egg quality, fry production and fry performance in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) and *O. mossambicus* (Peters). PhD Thesis, Institute of Aquaculture, University of Stirling, UK, 295p.
- RANA, K.J. (1988). Reproductive biology and the hatchery rearing of tilapia eggs and fry. In: MUIR, J.F., ROBERTS, R.J. (Eds.), *Recent Advances in Aquaculture*. Croom Helm, London, p. 343-406.
- RIDHA, M.T., CRUZ, E.M. (2000). Effect of light intensity and photoperiod on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. seed production. *Aquaculture Research*, v.31, p.609-617.
- SALAMA, M.E. (1996). Effects of sex ratio and feed quality on mass production of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), fry. *Aquaculture Research*, v.27, p.581-585.
- SANTANA, F.M.D.S., LUCENA, L.B., SANTANA, C.A.D.S., BÁRBARA, C.D.L., SANTANA, N.D.M., MELO, K.S. (2010). Yield, humidity, acceptance and preference of tilapia submitted to smoking process. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.5, p.423-427.
- SANTOS, L.S., OLIVEIRA FILHO, D.R., SANTOS, S.S., NETO, M.A.S., LOPES, J.P. (2007). Prolificidade da tilapia-do-nilo, variedade chitralada, de diferentes. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v.2, p.26-34.
- SCHRECK, C.B., CONTRERAS-SANCHEZ, W., FITZPATRICK, M.S. (2001). Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, v.197, p.3-24.
- SCHULTER, E.P., VIEIRA FILHO, J.E.R. (2017). Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilapia (No. 2328). Texto para Discussão.
- SHELTON, W.L. 1998 Artificial propagation tilapia for chromosome manipulation. In: BURKE, D.; BAKER, J.; GOETZE, B.; CLAIR, D.; EGNA, H. (Ed.). Oregon: Fifteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture. p.25-29.
- SHELTON, W.L. 2000 Methods for androgenesis techniques applicable to tilapia. In: McELWEE, K.; BURQUE, D.; NILES, M.; EGNA, H. (Ed.). Oregon: Seventeenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture. p.51-55.

- SHELTON, W.L. 2002 Monosex Tilapia Production through Androgenesis. In: McELWEE, K.; LEWIS, K.; NIDIFFER, M.; BUITRAGO, P. (Ed.). Oregon: Nineteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture. p.1-9.
- SOUZA, U.N., FELIZARDO, V.O., FREITAS, R.T.F., MELO, C.C.V., FERREIRA, M.R., REIS-NETO, R.V. (2016). 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.
- STREIT JR, D.P., DE MORAES, G.V., RIBEIRO, R.P., CARDOZO, R.M., MOREIRA, H.L.M. (2002). As Tendências da Utilização do Extrato de Hipófise na Reprodução de Peixes-Revisão. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v.5, p.231-238.
- TUZINE, T.A.R. Sincronização e indução hormonal na reprodução de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2018. 42f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- TWITCHEN, I.D., EDDY, F.B. (1994). Effects of ammonia on sodium balance in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Aquatic Toxicology*, v.30, p.27-45.
- VALENTIN, F.N. (2007). Efeito da idade das matrizes de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* no desenvolvimento embrionário e larval. 2007. 43f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- VENTURIERI, R., BERNARDINO, G. (1999). Arapaima: Endangered species can be saved through culture. *Panorama da Aquicultura*, v.9, p.13-21.
- WAGNER, P.M., RIBEIRO, R.P., MOREIRA, H.L.M., VARGAS, L., POVH, J.A. (2004). Avaliação do desempenho produtivo de linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em diferentes fases de criação. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, v.26, p.187-196.
- WEDEMEYER, G.A., BARTON, A.B., MCLEAY, D.J. (1990). Stress and acclimatization, pp. 451-489. In: Shreck, C.B., Moyle, P.B. Eds., Methods for fish biology. *American Fisheries Society*, Bethesda, MD, USA.
- YARON, Z., COCOS, M., SALZER, H. (1980). Effects of temperature and photoperiod on ovarian recrudescence in the cyprinid fish *Mirogrex terraesanctae*. *Journal of Fish Biology*, v.16, p.371-382.
- ZANIBONI FILHO, E., WEINGARTNER, M. (2007). Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, p.367-373.
- ZIMMERMANN, S. (2000). O bom desempenho das chitraladas no Brasil. *Panorama da Aquicultura*, v.10, p.15-19.
- ZIMMERMANN, S. (2003). Um moderno instrumental genético no melhoramento e na rastreabilidade de tilápias nilóticas. *Panorama da Aquicultura*, v.13, 69 p.
- ZIMMERMANN, S., FITZSIMMONS, K. (2004). Tilapicultura intensiva. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (Org.) Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. 1. ed. São Paulo: TecArt., v.1, p.239-266.

**5 ARTIGO****Short Communication****Use of hCG hormone in the natural and artificial reproduction of Nile tilapia  
(*Oreochromis niloticus*)**

Ragli Oliveira Azevedo<sup>(1)</sup>, Érika Ramos de Alvarenga<sup>(1)</sup>, Arthur Francisco Araújo Fernandes<sup>(2)</sup>,  
Marcos Antonio da Silva<sup>(1)</sup>, Gabriel Francisco de Oliveira Alves<sup>(1)</sup>, Williane Ferreira  
Menezes<sup>(1)</sup>, Eduardo Maldonado Turra<sup>(1)\*</sup>.

<sup>(1)</sup>NGTAqua. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos. nº 6627. Caixa Postal 567. Campus da UFMG. CEP 30123-970. Belo Horizonte. MG – Brazil.

<sup>(2)</sup>Department of Animal and Dairy Sciences, University of Wisconsin – Madison, 472 Animal Science Building 1675, Observatory Dr., Madison, WI 53706, USA.

\*Corresponding author

Phone: 55 31 3409 3306

E-mail: [eduardoturra@yahoo.com.br](mailto:eduardoturra@yahoo.com.br)

## Abstract

Synchronization of ovulation or spawning by hormonal protocols can allow for better reproductive management in a large diversity of domestic animals. Even though Nile tilapia reproduces naturally in captivity, seed production could benefit from the synchronization of spawning. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of hormonal induction by hCG on the natural and artificial spawning of Nile tilapia. For this evaluation, two experiments were performed. In the first one, eighty young females ( $344 \pm 90$  g, close to 1 year old), forty old females ( $565 \pm 152$  g, close to 3 years old), and 75 males ( $527 \pm 109$  g, close to 1 year) were used. Young and old females were divided into two groups: (1) females induced with hCG at a dose of  $3 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  of live weight and (2) control females that received serum, both by the intracoelomic route. We evaluated three breeding cycles of 7 days long each, where each female received the injection just before being stocked with the males for natural reproduction in 5,000 L tanks (8 females: 5 males). After we obtained the results from the first experiment and intending to try to clarify doubts that arose, a second experiment was carried out. We evaluated different doses (0.5, 1.5, 2.5, and  $3.5 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  female), number of injections (1 or 2), and administration route (intracoelomic or intramuscular) of hCG hormone in 40 females for artificial reproduction by stripping. Our results indicate that the use of hCG hormone in a dose of  $3 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  of live weight is not effective for synchronization of natural reproduction in Nile tilapia and the negative effect of age on reproductive performance was not reversed by the use of this hormone. In the second assay, the reproductive performance was clearly higher in Nile tilapias that received one injection in comparison to those treated with two injections. There was no statistical difference between the administration routes evaluated (intracoelomic or intramuscular). The use of a single injection with lower doses of hCG (especially 0.5 and  $1.5 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  of female) resulted in 100% of spawned females in artificial reproduction and these doses should be investigated in future studies on the synchronization of natural spawning in Nile tilapia.

**Keywords:** hormonal induction, tilapia reproduction, reproduction on-farm, reproductive synchronization.

## 5.1 Introduction

Synchronization of ovulation or spawning by hormonal protocols can allow better reproductive management in a large diversity of domestic animals (Srisakultiew and Wee, 1988; Martemucci and D'Alessandro, 2011; Piamsomboon et al., 2019). These protocols are species-specific, however, they aim at common goals including the manipulation of follicle development, the improvement of oocyte quality and the increase of egg/embryo quantity and embryo survival (Saldarriaga et al., 2006; Mylonas et al., 2010; Martemucci and D'Alessandro, 2011; Bisinotto et al., 2014; Fouroughifard et al., 2019; Piamsomboon et al., 2019). Reproductive synchronization protocols have been applied to optimize both natural and artificial reproduction (Srisakultiew and Wee, 1988; Mylonas et al., 2010; Martemucci and D'Alessandro, 2011).

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), one of the most extensively cultured tropical freshwater species (FAO, 2018), is a multiple spawner and maternal mouthbrooder that easily reproduces under captivity conditions (Pullin et al., 1991; Bhujel, 2000; Piamsomboon et al., 2019). Despite this, the seed production of Nile tilapias faces limitations, such as the low egg production and unpredictable spawning (Little et al., 1993; Bhujel, 2000; Ng and Romano, 2013). In tilapia breeding programs and hatcheries, these limitations result in a large number of parental stock required in order to meet the demand for seed or a long time to reach the expected quantity of offspring in addition to high labor cost (Bhujel, 2000; El-Sayed, 2006 Trong et al., 2013). Therefore, exogenous hormone manipulations could contribute to the control of reproductive processes of tilapia, increasing spawning predictability, allowing a higher number of vitellogenic oocytes to become mature oocyte, and maximizing seed output by exploiting the reproductive potential of the broodstock.

Protocols of spawning induction by hormones in Nile tilapia have been applied mainly for collecting of gametes in procedures of chromosome manipulations (Fernandes et al., 2013; Pradeep et al., 2014; Alvarenga et al., 2020), for reproductive biology studies (Babiker and Ibrahim, 1979; El-Gamal and El-Greisy, 2005; Alvarenga et al., 2017) and for facilitating the breeding of Nile tilapia in pair mating selection (Fernandes et al., 2013; Piamsomboon et al., 2019). However, according to our knowledge, there is only one study of hormonal protocols for synchronization of natural spawning described in Nile tilapia (Srisakultiew and Wee, 1988), in which a partial success of synchronization of spawning was obtained with 0.25 and 0.5 IU hCG · g<sup>-1</sup> of female. Thus, the aim of the present study was to develop a protocol to synchronize final oocyte maturation and oocyte collection in both natural and artificial reproduction of Nile

tilapia. First, we evaluated the effectiveness of the hCG protocol described by Fernandes et al. (2013) for the synchronization of natural spawning and larvae production. Then, to optimize the artificial reproduction protocol in this species, we analyzed the effects of administration route, different dosages, the number of doses, female age, and weight on reproductive success.

## **5.2 Material and methods**

### **5.2.1 Location, broodstock, and management**

Both experiments were carried out in agricultural greenhouses under natural light and containing tanks of 5,000 L. In the experiments were used animals from the Nile tilapia stock (Chitralada line) of the Nucleus of Studies in Nutrition, Genetics, and Technology in tilapia culture (NGTAqua) of the Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). All procedures with animal manipulation were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals - UFMG under protocol number 283/2019.

Individual male and female Nile tilapia were identified by Passive Integrated Transponder (PIT) tags. The tilapia were maintained and fed under ideal conditions. The individuals were fed until apparent satiety, twice a day, with extruded commercial feed containing 32% crude protein and granulometry of 4 to 6 mm. A random selection of males and the selection of females that presented an enlarged and reddish genital papilla and cambered ventral region (“ready to spawn”) were carried out. Then, the selected animals were submitted to the procedures described above for each experiment and transferred to breeding tanks.

The water quality was monitored daily using the YSI 6920 V2 probe (YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, USA). During the experiments, the means of the water quality parameters and their standard deviation were: temperature =  $28.36 \pm 1.49^{\circ}\text{C}$ ; salinity =  $0.33 \pm 0.27 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; dissolved oxygen =  $5.98 \pm 1.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; and pH =  $7.48 \pm 0.88$ .

### **5.2.2 Experiment 1: Use of hCG hormonal induction in natural reproduction.**

The first experiment was carried out to evaluate whether hormonal induction would promote an effective increase in larvae production in females under natural reproduction, which is the breeding strategy commonly adopted in tilapia hatchery. A larger number of larvae could be obtained due to the increased oocyte production per female and/or the greater number of females spawning and with eggs in the mouth at the end of the cycle of breeding with the males,

meaning greater synchronicity between them. Eighty young females (close to 1 year old,  $344 \pm 90$  g), forty old females (close to 3 year old,  $565 \pm 152$  g) and 75 young males (close to 1 year old,  $527 \pm 109$  g) were used. The females were divided into two groups: one group received injections of hCG (Vetecor, Calier Laboratory, Spain) (single dose of  $3 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  female) and another group received only serum (control), both by the intracoelomic route. The females of different ages were randomly divided into the two groups (hormone induced or not) while accounting for equal number and body weight. When considering all females, regardless of age, 60 females ( $420 \pm 149$  g) were induced by hCG and 60 control females ( $416 \pm 163$  g) were injected with the serum. The dose of  $3 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  of female was used as suggested by Fernandes et al. (2013) since in their study this dose could promote a greater balance between the number of eggs and quality, which could result in a greater quantity of healthy larvae.

Females induced or not were stocked with males for natural reproduction in three breeding cycles, each of 7 days long. The females received the injections just before being stocked with the males. In each cycle, all females and males were replaced and a different group was used. The stocking density was eight females and five males in 5,000 L tanks and at the end of the cycle, the females with eggs in their mouths were transferred to individual hapas ( $1 \text{ m}^3$  volume) allocated in other 5,000 L tanks for mouthbrooding. Close to one week of incubation and after absorption of yolk sac, the larvae from each female were counted. Percentage of spawned females, number of larvae per gram of female and per female were evaluated to compare the reproductive performance of females hCG-induced against the control group and their age combinations: hCG and control in young females (hCG-Y and Ct-Y) and hCG and control in old females (hCG-O and Ct-O)

### **5.2.3 Experiment 2: Comparisons of doses, administration routes, and number of injections of hCG in assisted reproduction of tilapia.**

After we obtained the results from the first experiment and intending to clarify doubts that arose, a second experiment was carried out to obtain results on the induction of tilapia by hCG that had not yet been evaluated in the literature or that needed to be better defined (doses and routes and number of injections of hCG). Four doses were evaluated ( $0.5$ ,  $1.5$ ,  $2.5$  and  $3.5 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  female); two routes of administration, intracoelomic (C) or intramuscular (M); and two numbers of injections, one (1I) or two injections (2I) of the hCG hormone in 40 females. The “ready to spawn” females were previously selected in order to assess the influence of treatment variables on the release of oocytes by stripping. Regarding the number of injections, two



methods of administration were tested: one injection (a single total dose) or two injections, a first dose with 10% of the total dose and a second with the remaining 90%, with an interval of 18 hours between them. After 24 h of application of the final dose (or the single injection) when the oocytes were easily released, the females were striped. Three 0.5 mL samples of the oocyte striped from each female were counted and the average number of eggs  $\cdot\text{mL}^{-1}$  was estimated. The average result of the number of oocytes per mL was multiplied by the total volume, in mL, of striped oocytes obtained by each female. For the analysis, relative fecundity (number of eggs per gram of female body weight) and absolute fecundity (number of eggs per female) were used.

Percentage of spawned females, relative and absolute fecundity were evaluated by doses, administration routes, number of injections and their combinations: doses with administration routes (0.5C, 0.5M, 1.5C, 1.5M, 2.5C, 2.5M, 3.5C, and 3.5M), number of hCG injections with administration routes (1I-C, 1I-M, 2I-C and 2I-M) and doses with number of injections (0.5-1I, 0.5-2I, 1.5-1I, 1.5-2I, 2.5-1I, 2.5-2I, 3.5-1I and 3.5-2I).

#### 5.2.4 Statistical Analysis

The results were analyzed using the “R Studio” software (RStudio Team, 2020). Except for body weight data, the assumptions of ANOVA (normality and homogeneity of variances of residuals) were not met and the other data were analyzed by non-parametric tests. Fisher's exact test was used to analyze the percentage of spawning females and the multiple comparisons between groups were performed using the *rcompanion* package (Mangiafico, 2016) in R language (R Core Team, 2016). Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used in the analysis of relative fecundity, absolute fecundity, number of larvae per gram of female, and per female.

For the analysis of reproductive success, in the first experiment, a logistic regression with binomial error distribution was fitted:

$$\text{Logit}(\pi_i) = \log\left(\frac{\pi_i}{1 - \pi_i}\right) = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

(Model 1)

Where  $\pi_i$  is the probability  $i$  of reproductive success, reproductive success ( $\pi$ ) is a binary response variable (if female spawned:  $\pi = 1$ , otherwise  $\pi = 0$ ),  $\mu$  is the intercept,  $\alpha$  is the effect of hormone use ( $i$ , yes = 1 or no = 0),  $\beta$  is the effect of female age ( $j$ , young female = 1 or old

female = 0), and  $\varepsilon_{ij}$  is the residual error. Also, the interaction between hormone use and female age and the effect of the week of breeding were evaluated. Nevertheless, they were not significant and thus were removed from the final model fitted.

In the second experiment, the effects of different doses, number of injections, body weight, and administration route (intracoelomic or intramuscular route) on the reproductive success of females were investigated using logistic regression with a binomial error distribution. Since administration route was not significant ( $p > 0.05$ ), the final model fitted was:

$$\text{Logit}(\pi_i) = \log\left(\frac{\pi_i}{1 - \pi_i}\right) = \mu + \alpha_i + \beta + \alpha_i\beta + \gamma_j + \varepsilon_{ij}$$

(Model 2)

where  $\pi_i$  is the probability  $i$  of reproductive success, reproductive success is a binary response variable (if female spawned:  $\pi = 1$ , otherwise  $\pi = 0$ ),  $\mu$  is the intercept,  $\alpha$  is the effect of dose ( $i$  is 0.5, 1.5, 2.5, and 3.5 UI·g<sup>-1</sup> of female),  $\beta$  is the effect of body weight (range 196 to 477 g),  $\alpha\beta$  is the interaction of dose and body weight,  $\gamma$  is the effect of the number of injections ( $j$ , 1 or 2 injections) and  $\varepsilon_{ij}$  is the residual error. These statistical analyses were conducted using the InfoStat program (Di Rienzo et al., 2015). For all statistical analyses, the differences were considered significant when  $p < .05$ .

## 5.3 Results

### 5.3.1 Experiment 1: Use of hCG for hormonal induction in natural reproduction.

The proportion of spawned females, the larvae production per female, and per gram of female of the control group was equal to those from the hCG group (Table 1). When only spawned females were considered, the larvae production per gram of female was higher in the control than in the hCG group, which explains the higher total larvae production observed when the sum of larvae production of the three cycles was calculated.

Table 1 – Number of induced females (N), average body weight (g), percentage of spawned females (%), average of larvae production per female (min-max), average of larvae production per gram of female (min-max), average of larvae production per reproduced female (min-max), average of larvae production per gram of reproduced female (min-max) and total production of larvae at the end of three breeding cycles and coefficient of variation (CV), in treatments with the use of hCG or control (serum).

Variables	Treatments		CV
	hCG	Control	
N	60	60	-
Body weight (g)*	420 <sup>a</sup>	416 <sup>a</sup>	37.33
Spawned females (%)**	41.7	45.0	-
Larvae production per g of female*** (min-max)	0.88 <sup>a</sup> (0 – 3.35)	0.30 <sup>a</sup> (0 – 5.66)	-
Larvae production per female *** (min-max)	305 <sup>a</sup> (0 – 1,173)	410 <sup>a</sup> (0 – 2,090)	-
Larvae production per g of reproduced female (min-max)***	2.03 <sup>b</sup> (0.35 – 3.35)	2.88 <sup>a</sup> (0.49 – 5.66)	-
Larvae production per reproduced female*** (min-max)	704 <sup>a</sup> (202 – 1,173)	912 <sup>a</sup> (127 – 2,090)	-
Total larvae produced (sum of 3 breeding cycles <sup>1</sup> )	18,312	24,630	-

\* Values did not differ by ANOVA ( $p > .05$ ).

\*\* Values did not differ by Fisher's exact test ( $p > .05$ ).

\*\*\* Values with different letters differ by the Mann-Whitney test ( $p < .05$ ).

<sup>1</sup>Each cycle was 7 days longer.

In Table 2 is presented the analysis when accounting for female age as a factor. As expected, the average body weight of old females was higher than of young females. For the proportion of spawned females, larvae production per female, and per gram of female, differences were detected only between the young and old control groups.

Table 2 – Number of induced females (N), average body weight (g), percentage of spawned females (%), average of larvae production per female (min-max), average of larvae production per gram of female (min-max), average of larvae production per spawned female (min-max), average of larvae production per gram of spawned female (min-max) and total production of larvae in experiment 1, for the treatments hCG-Y (younger females induced by hCG), hCG-O (older females induced by hCG), Ct-Y (control younger females), Ct-O (control older females).

Variables	Treatments			
	hCG-Y	hCG-O	Ct-Y	Ct-O
N	40	20	40	20
Body weight (g)*	344 <sup>b</sup>	570 <sup>a</sup>	344 <sup>b</sup>	559 <sup>a</sup>
Spawned females (%)**	45.0 <sup>ab</sup>	35.0 <sup>ab</sup>	57.5 <sup>a</sup>	20.0 <sup>b</sup>
Larvae production per female*** (min-max)	327 <sup>ab</sup> (0 – 1,173)	261 <sup>ab</sup> (0 – 1,035)	516 <sup>a</sup> (0 – 2,090)	199 <sup>b</sup> (0 – 1,667)
Larvae production per g of female*** (min-max)	1.01 <sup>ab</sup> (0 – 3.35)	0.61 <sup>ab</sup> (0 – 2.79)	1.66 <sup>a</sup> (0 – 5.03)	0.56 <sup>b</sup> (0 – 5.66)
Larvae production per spawned female*** (min-max)	726 <sup>a</sup> (308 – 1,173)	657 <sup>a</sup> (202 – 1,035)	897 <sup>a</sup> (127 – 2,090)	997 <sup>a</sup> (244 – 1,667)
Larvae production per g of spawned female*** (min-max)	2.25 <sup>a</sup> (1.06 – 3.35)	1.53 <sup>a</sup> (0.35 – 2.80)	2.90 <sup>a</sup> (0.55 – 5.03)	2.80 <sup>a</sup> (0.49 – 5.66)
Total production of larvae (sum of 3 breeding cycles <sup>1</sup> )	13,060	5,252	20,641	3,989

\* Values with different letters differ by ANOVA ( $p < .05$ ).

\*\* Values with different letters differ by Fisher's Exact test ( $p < .05$ ).

\*\*\* Values with different letters differ by Kruskal Wallis's test ( $p < .05$ ).

<sup>1</sup>Each cycle was 7 days longer.

The logistic regression model analysis of factors affecting the reproductive success of females induced to spawning in natural reproduction is shown in Table 3. Only the age of female had an effect on the reproductive success of tilapia under natural reproduction. The model's coefficient and odds ratio showed that young females are 2.45 times more likely to have reproductive success than old females.

Table 3 - Results of fitting the logistic regression model (Model 1) to the reproductive success of Nile tilapia females in natural reproduction.

Variables*	Coefficient	OR	95% CI	P-value
Intercept	-0.88	0.41	0.19 – 0.90	0.0251
Hormone use: hCG	-0.07	0.93	0.45 – 1.95	0.8511
Age: young females	0.90	2.45	1.10 – 5.49	0.0291

\*Log Likelihood = -79.84, gl = 117; OR = Odds ratio.

### 5.3.2 Experiment 2: Comparisons of doses, administration routes and number of injections of hCG in artificial reproduction of tilapia.

The results of the reproductive performance of Nile tilapia submitted to different doses of hCG (0.5, 1.5, 2.5, and 3.5 IU·g<sup>-1</sup> female) are shown in Table 4. As expected, the body weight of females submitted to different hCG doses was similar. The proportion of spawned females was 80% in the group submitted to 1.5 IU·g<sup>-1</sup> female and 40% in the groups that received 2.5 and 3.5 IU·g<sup>-1</sup> female, however, these differences were not significant by Fisher's exact test ( $p > 0.05$ ). Relative and absolute fecundity of all females or only of reproduced females were similar among the dose treatments ( $p > 0.05$ ).

Table 4 – Number of females induced (N), average body weight (g), percentage of spawned females (%), average relative fecundity (number of eggs per gram of female), average absolute fecundity (number of eggs per female), average relative and absolute fecundity of spawned females and coefficient of variation (CV) in the dose treatments: 0.5 ( $0.5 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  female), 1.5 ( $1.5 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  female), 2.5 ( $2.5 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  female) and 3.5 ( $3.5 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  female) of hCG.

Variables	Dose treatments ( $\text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$ )				CV
	0.5	1.5	2.5	3.5	
N	10	10	10	10	-
Body weight (g) *	312.60	313.00	312.90	313.70	22.68
Spawned females (%)**	60	80	40	40	-
Relative fecundity (min-max)***	0.73 (0 – 2.43)	2.93 (0 – 13.41)	0.64 (0 – 2.7)	1.31 (0 – 4.44)	-
Absolute fecundity *** (min-max)	197 (0 – 480)	873 (0 – 3,890)	214 (0 – 804)	454 (0 – 1,578)	
Relative fecundity of spawned female*** (min-max)	1.22 (0.32 – 2.43)	3.67 (0.52– 13.41)	1.61 (0.93 – 2.74)	3.27 (0.97 – 4.44)	
Absolute fecundity of spawned female *** (min-max)	328 (153 – 480)	1092 (116 – 3,890)	537 (365 – 804)	1, 136 (380 – 1,578)	

\* Values did not differ by ANOVA ( $p > .05$ ).

\*\* Values did not differ by Fisher's exact test ( $p > .05$ ).

\*\*\* Values did not differ by the Kruskal Wallis test ( $p > .05$ ).

When evaluating the number of injections (1 or 2), differences were observed in the proportion of spawned females, relative and absolute fecundity when accounting for all females, and for spawned females (Table 5). Treatment with a single injection showed better results for all reproductive variables evaluated. The administration route (intracoelomic or intramuscular) of hCG and its combinations with the others studied factors did not affect the percentage of spawned females, relative and absolute fecundity for all females or for reproduced females (data not shown).

Table 5 – Number of females induced (N), average body weight (g), percentage of spawned females (%), average relative fecundity (number of eggs per gram of female), average absolute fecundity (number of eggs per female), average relative and absolute fecundity of spawned females and coefficient of variation (CV) in treatments with 1 (1I) or 2 (2I) injections of hCG.

Variables	Treatments (n° of injections)		CV
	1I	2I	
N	21	19	-
Body weight (g)*	312.00	314.21	22.68
Spawned females (%)**	77 <sup>a</sup>	22 <sup>b</sup>	-
Relative fecundity (min-max)***	2.94 <sup>a</sup> (0 – 13.41)	0.24 <sup>b</sup> (0 – 1.65)	-
Absolute fecundity (min-max)***	755 <sup>a</sup> (0 – 3,890)	80.42 <sup>b</sup> (0 – 498)	-
Relative fecundity of spawned female*** (min-max)	3.04 <sup>a</sup> (0.32 – 13.41)	0.92 <sup>b</sup> (0.52 – 1.65)	
Absolute fecundity of spawned female*** (min-max)	933 <sup>a</sup> (153 – 3890)	306 <sup>b</sup> (116 – 498)	

\* Values did not differ by ANOVA ( $p > .05$ ).

\*\* Values with different letters differ by Fisher's Exact test ( $p < .05$ ).

\*\*\* Values with different letters differ by Kruskal Wallis's test ( $p < .05$ ).

The combined results of doses and number of injections are shown in Table 6. All females submitted to a single injection of 0.5 or 1.5 UI·g<sup>-1</sup> of female spawned. The percentage of spawned females in the 0.5-1I and 1.5-1I treatments were higher than the 0.5-2I, 2.5-2I, and 3.5-2I treatments and did not differ from the others. For relative and absolute fecundity, the 1.5-1I treatment was higher than the 0.5-2I, 2.5-2I, and 3.5-2I treatments and similar to the others. The absolute and relative fecundity of spawned females was similar among the groups ( $p > 0.05$ ), probably due to the small number of spawned animals in some groups.

The logistic regression model analysis of factors affecting the artificial reproductive success of females is shown in Table 7.

Table 6 – Number of females induced (N), average body weight (g), percentage of spawned females (%), average relative fecundity (number of eggs per gram of female), average absolute fecundity (number of eggs per female), average relative and absolute fecundity of spawned females and coefficient of variation (CV) in the treatments with different doses and number of injections of hCG.

Treatments		N	Weight (g)*	Spawned females (%)**	Relative fecundity (min-max)***	Absolute fecundity (min-max.)***	Relative fecundity of spawned females (min-max.)***	Absolute fecundity of spawned females (min-max.)***
Doses (IU·g <sup>-1</sup> )	N° of injections							
0.5	1	5	312.20	100 <sup>a</sup>	1.36 <sup>ab</sup> (0.32 – 2.43)	361 <sup>ab</sup> (153 – 480)	1.36 <sup>a</sup> (0.32 – 2.43)	361 <sup>a</sup> (153 – 480)
0.5	2	5	313.00	20 <sup>b</sup>	0.11 <sup>c</sup> (0 – 0.53)	33 <sup>b</sup> (0 – 165)	0.53 <sup>a</sup> (0.53 – 0.53)	165 <sup>a</sup> (165 – 165)
1.5	1	6	308.67	100 <sup>a</sup>	4.53 <sup>a</sup> (1.57 – 13.41)	1353 <sup>a</sup> (468 – 3,890)	4.53 <sup>a</sup> (1.57 – 13.41)	1,317 <sup>a</sup> (468 – 3,890)
1.5	2	4	319.50	50 <sup>ab</sup>	0.54 <sup>bc</sup> (0 – 1.65)	154 <sup>b</sup> (0 – 498)	1.09 <sup>a</sup> (0.52 – 1.65)	307 <sup>a</sup> (116 – 498)
2.5	1	5	313.40	60 <sup>ab</sup>	1.10 <sup>abc</sup> (0 – 2.74)	356 <sup>ab</sup> (0 – 804)	1.83 <sup>a</sup> (1.28 – 2.74)	593 <sup>a</sup> (365 – 804)
2.5	2	5	312.40	20 <sup>b</sup>	0.19 <sup>bc</sup> (0 – 0.93)	74 <sup>b</sup> (0 – 369)	0.93 <sup>a</sup> (0.93 – 0.93)	369 <sup>a</sup> (369 – 369)
3.5	1	5	314.40	60 <sup>ab</sup>	2.42 <sup>abc</sup> (0 – 4.4)	832 <sup>ab</sup> (0 - 1,578)	4.04 <sup>a</sup> (3.69 – 4.4)	1,387 <sup>a</sup> (1,163 - 1,578)
3.5	2	5	313.00	20 <sup>b</sup>	0.19 <sup>bc</sup> (0 – 0.97)	76 <sup>b</sup> (0 – 380)	0.97 <sup>a</sup> (0.97 – 0.97)	380 <sup>a</sup> (380 – 380)
CV			22.68	-	-	-	-	-

\* Values did not differ by ANOVA ( $p > .05$ ). \*\* Values differed by Fisher's exact test ( $p < .05$ ). \*\*\* Different letters differ by the Kruskal Wallis test ( $p < .05$ ).



Table 7 - Results of fitting the logistic regression model (Model 2) to the reproductive success of Nile tilapia in assisted reproduction by the use of hCG hormone.

Variables*	Coefficient	OR	95% CI	P-value
Intercept	12.07	-	-	0.0177
Dose	-4.97	0.01	0 – 0.54	0.0251
Body weight	-0.02	0.98	0.96 – 1.01	0.1767
Dose × Body weight	0.01	1.01	1.0 – 1.03	0.0404
Nº of injections	-3.42	0.03	0.004 – 0.28	0.0019

\*Log Likelihood = -16.61, gl = 35; OR = Odds ratio.

Doses, number of injections, and interaction Dose × Body weight had a significant effect on female reproductive success. The increase in dosage and number of injections resulted in decreased reproductive success of females. The body weight did not have any significant effect on reproductive success; however, we found a significant effect of the interaction between body weight and dose. The results suggest the lower doses per gram of female are more effective in animals with lower body weights.

## 5.4 Discussion

The use of the hCG hormone as a spawning inducer has been used in the last decades in tilapia mainly with the purpose of obtaining gametes for *in vitro* fertilization, through the extrusion of breeders (Garcia-Abiado et al., 1994; Senthilkumaran et al., 2002; Yoshiura et al., 2003; Carrillo and Romagosa, 2004; El-Gamal and El-Greisy, 2005; Owusu-Frimpong, 2008; Fernandes et al., 2013; Souza et al., 2016; Alvarenga et al., 2020). The hCG has very strong LH activity and stimulates the final oocyte maturation in Nile tilapia (Mylonas et al., 2010).

Theoretically, hCG or LH stimulates the theca cells to produce  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone concurrently with the increase of the expression of  $20\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ( $20\beta$ -HSD) in postvitellogenic follicles (Senthilkumaran et al., 2002).  $20\beta$ -HSD activity in the granulosa cells converts  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone to  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ( $17\alpha,20\beta$ -DP), a maturation-inducing hormone (MIH) (Nagahama and Yamashita, 2008). Since Nile tilapia is a fish with asynchronous ovarian development, we hypothesized that hCG use in natural or artificial reproduction could improve the synchronicity of spawning and, consequently, increase the broodstock productivity.

Srisakultiew and Wee (1988) used Chinese carp pituitary gland (PG) at 0.10, 0.25, 0.50 mg PG·100·g<sup>-1</sup> breeder and hCG at 0.10, 0.25, 0.50 and 1.0 IU hCG·g<sup>-1</sup> breeder to synchronize the natural spawning in Nile tilapia. According to these authors, hypophysation failed to induce spawning and only hCG presented a partial success at the doses of 0.25 and 0.5 IU·g<sup>-1</sup> of female, whose results were equal to or greater than those of the control group.

Considering the partial success described by Srisakultiew and Wee (1988) and the dose of 3UI of hCG·g<sup>-1</sup> of female recommended by Fernandes et al. (2013) for artificial reproduction, we outlined the first experiment using the dose recommended by Fernandes et al. (2013) to synchronize spawning under natural reproduction. The number of spawning females and the larvae production in our study were not different between the hCG and control groups.

In addition, the larvae production per gram of reproduced female was lower in the hCG group than in control, that could explain a total production of larvae about 35% higher in the control after three reproductive cycles.

Therefore, the results indicate that the use of 3UI·g<sup>-1</sup> of female does not improve the synchronization of female Nile tilapia under natural reproduction.

As expected, the reproductive performance of young females was better than those of old females. The chance of spawning in young females was 2.45 times higher than old females, which resulted in higher larvae production per female and per gram of female when we considered the entire group of females.

The effects of age on the reproductive performance of tilapias have been widely discussed by Bhujel (2000) and Getinet (2008) and our results are consistent with those described by these authors, that is, spawning frequency and larvae production capacity declined with age. We also hypothesized that hCG treatment could reduce the negative effects of age on spawning frequency, however, the results found do not confirm our initial hypothesis since the increase in the percentage of spawning in old females induced with hCG in comparison to old females in control was not significant.

The method of hCG administration for artificial reproduction is considered inconsistent among different studies and authors (Piamsomboon et al., 2019). Since the inconsistencies can be related to the use of different protocols, in the second experiment, the effects of different doses of hCG, administration routes, the number of injections, and the interaction of these factors on reproductive variables were jointly studied. The results of this analysis could even help to clarify the failure of hCG to synchronize natural reproduction.

The reported hCG dose to induce spawning in Nile tilapia varies with successful outcomes ranging from 0.25·g<sup>-1</sup> to 50 IU·g<sup>-1</sup> of female (Srisakultiew and Wee, 1988; Garcia-

Abiado et al., 1994; Carrillo and Romagosa, 2004; Fernandes et al., 2013; Pradeep et al., 2014; Souza et al., 2016).

For artificial reproduction, Garcia-Abiado et al. (1994) applied single doses of hCG to increase spawning rates in Nile tilapia, using doses of 0.5 to 3.5 IU hCG·g<sup>-1</sup> breeder, intramuscularly, in sexually mature females with body weight close to 60 g. According to these authors, the best dose was 3.5 IU hCG·g<sup>-1</sup> resulting in 75% spawned females.

Fernandes et al. (2013) indicated that the application of two intramuscular doses of hCG (between 1.0 and 5.0 IU·g<sup>-1</sup>) could be used to induce the final maturation of oocytes in Nile tilapia (close to 300 g) and recommended the dose of 3UI·g<sup>-1</sup> breeder that resulted in 70% of spawned female.

El-Gamal and El-Greisy (2005) used higher doses of hCG (double intramuscular applications of hCG with 25 and 50 IU·g<sup>-1</sup> of body weight) in breeders close to 20 g and obtained a maximum of spawned female of 75%.

Carrillo and Romagosa (2004) and Pradeep et al. (2014) did not test different doses but used hCG doses of 5 UI·g<sup>-1</sup> breeder and 1.5 UI·g<sup>-1</sup> breeder, respectively, to obtain gametes for chromosome manipulations. Interestingly, we used females between 196 to 477 g and did not identify differences in the proportion of spawned females submitted to different doses of hCG using conventional statistical analysis to compare frequency distribution (Fisher's exact test).

However, data analysis by logistic regression indicated that increasing the dose of hCG from 0.5 to 3.5 IU·g<sup>-1</sup> of breeder has a negative effect on spawning success. Thus, lower doses (0.5 and 1.5 IU·g<sup>-1</sup>) were more effective for spawning induction in this study, achieving 100% of spawned females when a single dose was used.

Another interesting result obtained by logistic regression analysis was the significant effect of the interaction between dose and body weight, suggesting the best dose is different for each body weight class. This result may explain, at least partially, the inconsistencies regarding the ideal dose found in different studies.

A clear effect of the number of injections of hCG was found in this study. While 77% of females that received a single injection of hCG spawned, only 22% of females submitted to two injections of hCG had success in spawning. Corroborating to the results presented in this study, Mylonas et al. (2010) argue that hCG is often effective in a single dose, presumably due to its long half-life in circulation. The differences found as a result of the number of injections may be related to the stress caused in handling the females when receiving two injections.

Similarly, Hirose (1980) found that repeated injections of hCG stressed the fish, causing a reduced rate of fertilization and hatching and low quality of the eggs. Therefore, a single

injection of hCG may be recommended for spawning induction in Nile tilapia. Since we did not find an effect of the administration route, both intracoelomic or intramuscular routes could be used for hCG administration.

In conclusion, our results indicate the use of the hCG hormone in  $3 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  breeder is not effective for synchronization of female Nile tilapia in natural reproduction and did not reverse the negative effects of age on reproductive performance. Since the use of a single injection with lower doses of hCG (especially  $0.5$  and  $1.5 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$  of female) resulted in 100% of spawned females in artificial reproduction, these doses should be investigated in future studies on the synchronization of natural spawning in Nile tilapia.

### **Acknowledgments**

This research received support from FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

### **Data Availability**

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

### **Conflict of Interest**

The authors have no conflict of interest to declare.

### **Author contributions statement**

Ragli O. Azevedo - contributed to the experimental design, data collection, data analysis, interpretation of data, and article preparation.

Érika R. Alvarenga - contributed to the experimental design, data collection, data analysis, interpretation of data, and article preparation.

Arthur Francisco Araújo Fernandes - contributed to the experimental design, data collection, and article preparation.

Marcos A. Silva - contributed to the data analysis, interpretation of data, and article preparation.

Gabriel Francisco de Oliveira Alves - contributed data collection and article preparation.

Williane Ferreira Menezes- contributed the data analysis and article preparation.

Eduardo M. Turra – contributed experimental design, data analysis, interpretation of data, article preparation, and coordination.

## REFERENCES

- ALVARENGA, E.R., FERNANDES, A.F.A, LOPES, L.R., SOARES, T.E., ALVES, G.F.O.A., COSTA, F.F.B., SALES, S.C.M., LIMA, G.K., TURRA, E.M., 2020. Attempt to produce a Nile tilapia tetraploid line by heat shock induction. *Aquaculture* 529, 735647.
- ALVARENGA, É.R., SALES, S.C.M., BRITO, T.S., SANTOS, C.R., CORRÊA, R.D.S., ALVES, G.F.O., MANDUCA, L.G., TURRA, E.M., 2017. Effects of biofloc technology on reproduction and ovarian recrudescence in Nile tilapia. *Aquac. Res.* 48, 5965-5972. <https://doi.org/10.1111/are.13420>
- BABIKERAN, M.M., IBRAHIM, D.H., 1979. Studies on the biology of reproduction in the cichlid *Tilapia nilotica* (L.): effects of steroid and trophic hormones on ovulation and ovarian hydration. *J. Fish Biol.* 15, 21-30. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1979.tb03569.x>
- BHUJEL, R.C., 2000. A review of strategies for the management of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in seed production systems, especially hapa-based systems. *Aquaculture* 181, 37-59. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00217-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00217-3)
- BISINOTTO, R.S., RIBEIRO, E.S.; SANTOS, J.E.P., 2014. Synchronisation of ovulation for management of reproduction in dairy cows. *Animal* 8, 151-159 <https://doi:10.1017/S1751731114000858>
- CARRILLO, M., ROMAGOSA, E., 2004. Efeito do choque térmico quente em ovos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*): tempo pós-fertilização e duração do processo na sobrevivência das larvas. *Bol. Inst. Pesca* 31, 55-64.
- DI RIENZO, J.A., CASANOVES, F., BALZARINI, M.G., GONZALEZ, L., TABLADA, M., ROBLEDO, C.W., 2015. INFOSTAT VERSION 2015. Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Cordoba. <http://www.infostat.com.ar>.
- EL-GAMAL, A.E.E., EL-GREISY, Z.A., 2005. Effect of photoperiod, temperature and hCG on ovarian recrudescence and ability of spawning in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *Egypt. J. Aquat. Res.* 31, 419-431.
- EL-SAYED, A.-F.M., 2006. *Tilapia Culture*. CABI Publishing, Oxfordshire, UK.
- FAO, 2018. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- FERNANDES, A.F.A., ALVARENGA, É.R., OLIVEIRA, D.A., ALEIXO, C.G., PRADO, S.A., LUZ, R.K., SACRAMENTO, N.L., TEIXEIRA, E.A., LUZ, M.R., TURRA, E.M., 2013. Production of oocytes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) for *in vitro* fertilization via hormonal treatments. *Reprod. Domest Anim.* 48, 1049-1055. <https://doi.org/10.1111/rda.12212>
- FOUROOGHIFARD, H., GHADIKOLAEI, K.R., ALLEN, S., MOEZZI, M., DEGHANI, R., ZAHEDI, M. R., 2019. Determining the appropriate time and hormone administration for induced spawning and egg production of the shoemaker spinefoot rabbitfish, *Siganus sutor* (Valenciennes, 1835) during the reproductive season. *Aquaculture*, 510, 318-322. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.062>
- GARCIA-ABIADO, M.A.R., PASCUAL, L.P., MAIR, G.C., 1994. Use of human chorionic gonadotrophin (hCG) for induced spawning in tilapia under laboratory conditions. *Asian Fish. Sci.* 7, 225-231.
- GETINET, G.T., 2008. Effects of maternal age on fecundity, spawning interval, and egg quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J. World Aquacult. Soc.* 39, 671-677. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00197.x>
- HIROSE, K., 1980. A bioassay for teleost gonadotropin using the germinal vesicle breakdown (GVBD) of *Oryzias latipes* oocytes *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 41, 108-114. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(80\)90039-8](https://doi.org/10.1016/0016-6480(80)90039-8)
- LITTLE, D.C., MACINTOSH, D.J., EDWARDS, P., 1993. Improving spawning synchrony in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquac. Res.* 24, 399-405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1993.tb00563.x>
- MARTEMUCCI, G., D'ALESSANDRO, A.G., 2011. Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF<sub>2α</sub>, GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Anim. Reprod. Sci.* 123, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.11.007>
- MANGIAFICO, S.S., 2020. An R Companion for the Handbook of Biological Statistics, version 2.3.25. [rcompanion.org/rcompanion/](http://rcompanion.org/rcompanion/). (Pdf version: [rcompanion.org/documents/RCompanionBioStatistics.pdf](http://rcompanion.org/documents/RCompanionBioStatistics.pdf))
- MYLONAS, C.C., FOSTIER, A., ZANUY, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 516-534. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.007>

- NAGAHAMA, Y., YAMASHITA, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev. Growth Differ.* 50, S195-S219. <https://doi:10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x>
- NG, W., ROMANO, N., 2013. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Rev. Aquacult.* 5, 220-254. <https://doi.org/10.1111/raq.12014>
- OWUSU-FRIMPONG, M., 2008. Controlled artificial reproduction in mouth brooding Tilapia with human Chorionic Gonadotropin. *JGSA* 10, 70-77. <https://doi.org/10.4314/jgsa.v10i2.18042>
- PIAMSOMBOON, P., MEHL, N.S., SIRIVAIDYAPONG, S., WONGTAVATCHAI, J., 2019. Assisted reproduction in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Milt preservation, spawning induction and artificial fertilization. *Aquaculture* 507, 139-143. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.019>
- PRADEEP, P.J., SRIJAYA, T.C., HASSAN, A., CHATTERJI A.K., WITHYACHUMNARNKUL, B., JEFFS, A., 2014. Optimal conditions for cold-shock induction of triploidy in red tilapia. *Aquacult. Int.* 22, 1163-1174. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9736-4>
- PULLIN, R.S., EKNATH, A.E., GJEDREM, T., TAYAMEN, M.M., MACARANAS, J.M., ABELLA, T.A., 1991. The genetic improvement of farmed tilapias (GIFT) project: the story so far. *Naga: the ICLARM quarterly* 14, 3-6.
- R CORE TEAM, 2016. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. URL <https://www.R-project.org/>.
- RSTUDIO TEAM, 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- SALDARRIAGA, J.P., COOPER, D.A., CARTMILL, J.A., ZULUAGA, J.F., STANKO, R.L., WILLIAMS, G.L., 2007. Ovarian, hormonal, and reproductive events associated with synchronization of ovulation and timed appointment breeding of *Bos indicus*-influenced cattle using intravaginal progesterone, gonadotropin-releasing hormone, and prostaglandin F<sub>2α</sub>. *J. Anim. Sci.* 85, 151-62. . <https://doi:10.2527/jas.2006-335>.
- SENTHILKUMARAN, B., SUDHAKUMARI, C.-C., CHANG, X.-T., KOBAYASHI, T., OBA, Y., GUAN, G., YOSHIURA, Y., YOSHIKUNI, M., NAGAHAMA, Y., 2002. Ovarian

carbonyl reductase-like 20 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase shows distinct surge in messenger RNA expression during natural and gonadotropin-induced meiotic maturation in Nile tilapia. *Biol. Reprod.* 67, 1080-1086. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1080>

SOUZA, U.N., FELIZARDO, V.O., FREITAS, R.T.F., MELO, C.C.V., FERREIRA, M.R., REIS-NETO, R.V., 2016. Influência do horário de aplicação e da variedade genética em fêmeas de tilápias *Oreochromis niloticus* submetidas à indução hormonal com hCG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 68, 215-223. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-7716>

SRISAKULTIEW, P., WEE, L.K., 1988. Synchronous spawning of Nile tilapia through hypophysation and temperature manipulation. In: *The Second International Symposium on Tilapias in Aquaculture, ICLARM Conference Proceedings 15* (ed. by R.S.V. Pullin, T. Bhukaswan, K. Tonguthai, J.L. Maclean), pp. 275-284. Department of Fisheries, Bangkok, Thailand and International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines.

TRỌNG, T.Q., VAN ARENDONK, J.A.M., KOMEN, H., 2013. Genetic parameters for reproductive traits in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): I. Spawning success and time to spawn. *Aquaculture* 416-417, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.032>

YOSHIURA, Y., SENTHILKUMARAN, B., WATANABE, M., OBA, Y., KOBAYASHI, T., NAGAHAMA, Y., 2003. Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction. *Biol. Reprod.* 68, 1545-1553. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010843>



ANEXOS



Figura 1- Leitura de chip



Figura 2 - Tanques de reprodução natural



Figura 3 - Preparo de injeção de HCG



Figura 4 - Fêmeas recebendo injeção



Figura 5- Extrusão de ovos



Figura 6 - Tilápia com ovos na boca



Figura 7- Hapas de incubação individual



Figura 8 - Fêmeas incubando ovos



Figura 9 - Larvas prontas para contagem



Figura 10 - Larvas em zoom