

INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN Y DEL DESOVE DEL YAMÚ, *Brycon siebenthalae*, CON IMPLANTES DE mGnRH-a

[Indução da ovulação e desova do yamú, *Brycon siebenthalae*, com implantes de mGnRH-a]

[Induction of ovulation and spawn of yamú, *Brycon siebenthalae*, with mGnRH-a implant]

Sandra Clemencia PARDO-CARRASCO¹, Héctor SUAREZ-MAHECHA¹, Diego MUÑOZ-LARA¹, José Alfredo ARIAS-CASTELLANOS¹, Hernando GIL¹

¹ Instituto de Acuicultura, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Meta, Colombia

Endereço/dirección/address: Carrera 42 # 20-25, Casa A 29 – Conjunto Residencial Lãs Margaritas – Villavicencio, Meta - Colombia

Correio eletrônico: shanyp@bol.com.br

RESUMEN

Fueron realizados tres tratamientos con mGnRH-a para inducir la ovulación y el desove del yamú (*Brycon siebenthalae*) y comparados con un tratamiento con extracto de pituitaria de carpa (EPC). El vehículo de aplicación del mGnRH-a empleado fue colesterol (75%) y celulosa (25%). A la vez el tratamiento de EPC fue administrado por vía intramuscular con previa verificación del estado de maduración gonadal de las hembras, mediante biopsia ovárica y presencia de semen en los machos. La efectividad de los tratamientos se determinó con la ocurrencia o no del desove, número de óvulos liberados, tasa de fertilización y tasa de eclosión. El 50% de las hembras tratadas con EPC desovó, y ninguna de las hembras tratadas con mGnRH-a en implantes desovó.

Palabras clave: *Brycon*; mGnRH-a; implantes de hormona; reproducción inducida

RESUMO

Foram realizados três tratamentos com mGnRH-a para induzir a ovulação e a desova do yamú (*Brycon siebenthalae*), e estes foram comparados com um tratamento com extrato de pituitária de carpa (EPC). O veículo de aplicação do mGnRH-a utilizado foi uma mistura de colesterol (75%) e celulose (25%). O EPC foi administrado por via intramuscular, com prévia verificação do estágio de maturação gonadal das fêmeas, mediante biopsia ovárica e presença de sêmen nos machos. A efetividade dos tratamentos foi determinada através da ocorrência ou não da desova, número de óvulos liberados, taxa de fertilização e taxa de eclosão. Do total de fêmeas tratadas com EPC, 50% desovou e, nenhuma das fêmeas tratadas com mGnRH-a desovou.

Palavras chaves: *Brycon*, mGnRH-a; implantes de hormônio; reprodução induzida

ABSTRACT

Three treatments with mGnRH-a were used to induce the ovulation and the spawning of yamú (*Brycon siebenthalae*) and were compared with a treatment using carp pituitary extract -CPE. The application vehicle of the mGnRH-a employed was cholesterol (75%) and cellulose (25%). The CPE was administered by intramuscular via and previous verification of the gonadal maturation state of the females was, made by means of ovarian biopsy and presence of semen in the males. The effectiveness of the treatments was determined with the occurrence or not of the spawn, number of liberated eggs, fertilization rate and hatchery rate. Considering the females treated with CPE, 50% spawned and none of those treated with mGnRH-a spawned.

Key words: *Brycon*; hormone implant; induced reproduction; mGnRH-a

Introducción

Brycon es un género de peces de agua dulce, con un gran número de especies, la mayoría con buena alternativa para la piscicultura en América Latina. En los ríos de los Llanos de Colombia se encuentra el yamú, *Brycon siebenthalae*, que como otros congéneres requiere de estudios que consigan estandarizar las técnicas de reproducción en confinamiento. Trabajos de biología reproductiva, inducción al desove de otras especies del género han

sido realizados (ROMAGOSA, 1998; ANDRADE-TALMELLI *et al.*, 1999) buscando los mismos objetivos.

El uso de factores liberadores de hormonas gonadotrópicas (LHRH o GnRH) en la reproducción de peces migratorios es una alternativa frente a la baja respuesta y al alto costo del extracto de hipófisis de carpa (EPC). La inyección de formas nativas de GnRH no ha sido efectiva en la elevación de las gonadotropinas en el plasma sanguíneo ni en la inducción al desove, probablemente por la rápida metabolización (CRIM; SHERWOOD; WILSON, 1988). El

GnRH es una molécula simple que puede ser sintetizada, produciéndose análogos (GnRH-a) 50 a 100 veces más potentes que las formas naturales (HARVEY y CAROLSFELD, 1993). Estas sustancias sintéticas tienen además de una potencia superior otras ventajas por ser moléculas puras, pequeñas y específicas que actúan directamente sobre las células blanco. Por esta razón se han desarrollado varios tipos de análogos, como el de mamífero, al cual se le atribuye la capacidad de incrementar los niveles circulantes de gonadotropinas y de inducir la ovulación y el desove en varios grupos de peces (CRIM; SHERWOOD; WILSON, 1988; ALMENDRAS *et al.*, 1988; CAROLSFELD *et al.*, 1988). Sin embargo, SATO *et al.* (1995) reportaron que la administración de hormonas en solución acuosa no es siempre la vía más adecuada para inducir la maduración en peces, pues la hormona inyectada de esta manera es rápidamente eliminada de la circulación sanguínea siendo necesario un tratamiento prolongado para completar la maduración (COOK y PETER, 1980; CRIM; SHERWOOD; WILSON, 1988; DUAN y HIRANO, 1991). SATO *et al.* (1995) coinciden con MYLONAS y ZOHAR (1995) en que múltiples inyecciones del análogo pueden ser efectivas, pero que pueden causar estrés por la manipulación. LEE; TAMARU; KELLEY (1986) reportaron el éxito que han tenido los implantes de diferentes matrices con GnRH-a en la inducción de salmónidos y chánidos, y desde la década del 40, de mamíferos. SHERWOOD *et al.* (1988) concluyeron que los implantes elaborados con 75% de colesterol y 25% de celulosa tienen una liberación en 24 horas del 90% de la hormona, las sustancias que componen la matriz no son tóxicas, son una excelente vía para péptidos y resultan muy económicas. En peces del género *Brycon* el tiempo de acción del análogo en solución acuosa, al parecer, no es suficiente para inducir la ovulación (PARDO-CARRASCO *et al.*, 1998, 1999; RAMOS y MENDOZA, 1997; HONCZARYK, 1997). El objetivo de este trabajo es evaluar el uso del GnRH-a embebido en implantes de celulosa y colesterol para proporcionar una liberación más lenta y continua y así asegurar un desove exitoso.

Materiales y Métodos

Este ensayo se desarrolló en el laboratorio de reproducción de la Estación Piscícola del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos, Villavicencio, Meta. Sus instalaciones están ubicadas a una altura de 420 m, sobre las coordenadas 4°05' latitud norte y 73°37' longitud

oeste, la media anual de temperatura es de 26°C, la humedad relativa, del 75% y la precipitación, de 4050 mm.

• Animales Experimentales

El lote de reproductores empleado fue obtenido por reproducción inducida en abril de 1997, mantenido a una densidad de 300 g/m² y alimentado al 3% de la biomasa, una vez al día, seis días a la semana, con ración comercial al 30% de PB. A partir del duodécimo mes de vida se realizaron muestreos mensuales para determinar el momento de inicio de la madurez sexual. A los dos años de edad se encontraron los ejemplares con un peso promedio de 1.29 kg, en estado maduro, hembras con ovocitos maduros y machos con semen. Se seleccionaron animales con la misma edad, los cuales fueron mantenidos bajo las mismas condiciones. La asignación de tratamientos se hizo completamente al azar.

• Manejo de Reproductores

Para los procesos de selección, marcación e inducción, los ejemplares se manipularon dentro de bolsas plásticas. La selección de las hembras se realizó de acuerdo con los criterios descritos por WOYNARVICH y HORVATH (1983) los cuales están basados en la observación del estado de la papila genital y en la flacidez abdominal; la selección se confirmó por el método de biopsia ovárica siguiendo el protocolo descrito por TAMARU *et al.* (1988). De cada hembra se tomaron dos muestras de aproximadamente 200 ovocitos, una al comienzo de la selección y otra al finalizar el ensayo. Cada muestra se dividió en dos porciones, una de ellas se fijó según la metodología de TAMARU *et al.* (1988) para posteriormente medir el diámetro de los ovocitos y la otra se sometió al líquido aclarador de Serra para determinar la posición de la vesícula germinativa. La selección de los machos se realizó por la presencia de líquido seminal bajo una leve presión abdominal.

La medición del diámetro de los ovocitos se realizó utilizando un estereoscopio marca NIKON triocular. En un ocular se instaló una reglilla que fue ajustada con una cámara de New Bauer para dar la medición en micras (µm).

• Tratamientos Hormonales

En el Cuadro 1 se presentan los tratamientos hormonales, número de animales por tratamiento, la vía y los protocolos empleados.

Cuadro 1. Tratamientos hormonales utilizados para la inducción de la ovulación y del desove del yamú, *Brycon siebenthalae*

| Tratamiento | Hormona | n | Solución | Protocolo de aplicación ¹ | | |
|-------------|----------------------|---|----------|--------------------------------------|-------|---------|
| 1 | EPC | 4 | acuosa | 0.5 mg/kg | (12h) | 5 mg/kg |
| 2 | mGnRH-a ² | 3 | implante | 20 µg/kg | | |
| 3 | mGnRH-a | 3 | implante | 50 µg/kg | - | - |
| 4 | mGnRH-a | 3 | implante | 100 µg/kg | - | - |

¹Todos los tratamientos recibieron una dosis preliminar de 0.25 mg/kg de EPC 24 horas antes de la primera dosis.

²Se empleó GnRH análogo de mamífero (D-Ala⁶, Pro⁹ etilamida GnRH; GnRH-a (mLHRH-a) de Laboratorios ARGENT®

Los machos fueron inducidos con EPC con el equivalente al 80% de las dosis de las hembras bajo el mismo protocolo de aplicación. La aplicación de una dosis preliminar de 0.25 mg/kg de EPC 24 horas antes de la primera dosis definitiva se realizó para todos los ejemplares machos y hembras, de acuerdo con ZANIBONI-FILHO y BARBOSA (1996), para unificar el estado de los ovocitos antes de empezar el tratamiento definitivo.

Después de la última inyección de dosis hormonal en las hembras del tratamiento con EPC, fue medida la temperatura cada hora para determinar el número de horas-grado a las cuales ocurrió la ovulación. A partir de las 150 horas-grado (PARDO-CARRASCO *et al.*, 1999) se comenzó a revisar las hembras para determinar la ocurrencia de la ovulación.

La evaluación de los tratamientos se hizo considerando la ocurrencia o no de la ovulación y del desove, la cantidad de óvulos liberados, la tasa de fertilización y la tasa de sobrevivencia embrionaria. Los huevos valorados en gramos por hembra, fueron obtenidos por un solo estrujamiento. La colección del semen se hizo luego de recoger los óvulos, los que se fertilizaron en seco y luego se procedió a activar los espermatozoides con agua, se lavaron los huevos y se colocaron en incubadoras cónicas de flujo ascendente de 1.5 litros de capacidad, con un recambio de 250 ml/min. Para cada hembra que desovó se utilizaron tres incubadoras con 10 gramos de huevos, fertilizados con 0.25 ml de semen.

La tasa de fertilización se evaluó en la fase de cierre del blastoporo, aproximadamente 6 horas después de ocurrido el desove, contando 300 huevos de cada incubadora. El porcentaje de sobrevivencia embrionaria se midió 10 horas post desove, en la fase de embrión avanzado.

• Fabricación de los Implantes

Los implantes con mGnRH-a fueron preparados siguiendo la metodología descrita por LEE; TAMARU; KELLEY (1986) y con una modificación en los componentes descritos por LEE; TAMARU; KELLEY. (1986) y SHERWOOD *et al* (1988). Cada implante fue preparado

individualmente de acuerdo con el peso de la hembra, para que la dosis final fuese de 20 mg/kg, 50 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente, para los tratamientos 2, 3 y 4.

Cada implante pesaba entre 20 y 22 mg, la matriz se elaboró con un 75% de colesterol y 25% de celulosa. La hormona pesada para cada hembra según su peso, se disolvió en alcohol del 50% y se adicionó a la mezcla en seco de celulosa y colesterol. Luego de evaporado el alcohol, se adicionó manteca de cacao en un 5%, como aglutinante. En un molde de acrílico con agujeros de 2.4 mm de diámetro por 5 mm de longitud se prensó la mezcla para darle forma al implante. La aplicación se hizo intramuscular en la región dorsal, dos centímetros debajo de la aleta dorsal, con una aguja adaptada a un émbolo que empujaba el implante dentro del músculo.

• Análisis Estadístico

Para los parámetros de reproducción se realizó estadística descriptiva y para el diámetro de los ovocitos se hizo análisis de varianza y en caso de encontrar diferencias se realizó la prueba de Bonferroni para comparar las medias. En todos los casos, $P < 0.05$.

Resultados y discusión

La temperatura a la cual ocurrieron los desoves fue de 27.3 ± 0.62 °C. Las hembras que no desovaron se continuaron revisando hasta completar 982.6 horas-grado (44 horas) después del tratamiento, momento en el cual se cerró el experimento y se tomó la muestra final de ovocitos.

Al momento de la selección, las hembras de todos los tratamientos presentaron un 51.5 ± 5 % de los ovocitos en estado migrando y el diámetro ovocitario osciló entre 1136.6 a 1183.7 micras.

El 50 % de las hembras inducidas con EPC desovó (Tabla 1). Trabajos previos de PARDO-CARRASCO *et al.* (1999) reportan el 56.6% para esta misma especie y ZANIBONI FILHO y BARBOSA (1996) reportan para *Brycon orbignyanus* (matrinxã) un porcentaje de éxito de 66.7 con EPC bajo el mismo protocolo de aplicación.

Tabla 1. Resultados obtenidos con los diferentes protocolos de inducción de la ovulación y del desove de hembras de yamú *Brycon siebenthalae* con EPC y mGnRH-a

| Tto | n ¹ | Peso medio (kg) | Tiempo para el desove | | Peso de huevos (g) | Fecundidad relativa # huevos/kg | Fecundidad absoluta ² | Tasa de Fertilización (%) | Tasa de Supervivencia Embrionaria (%) |
|-----|----------------|-----------------|-----------------------|-------------|---------------------------------|---|---|---------------------------|---------------------------------------|
| | | | (h) | (°/h) | | | | | |
| 1 | 4/2 | 1.32±0,05 | 6.0 ± 0.5 | 164 ± 20 | 1.0x10 ² ± 5.3x10 | 1.03 x 10 ⁵ ± 4.7 x 10 ³ | 1.61 x 10 ⁵ ± 8.1 x 10 ⁴ | 91.5 ± 2.3 | 90.01 ± 3.1 |
| 2 | 3/0 | 1.25±0,02 | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | 3/0 | 1.18±0,01 | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | 3/0 | 1.41±0,01 | - | - | - | - | - | - | - |

¹ Hembras tratadas/ hembras desovadas² Óvulos obtenidos en un solo estrujamiento

La ovulación ocurrió en promedio a las 164±20 (horas-grado) y la cantidad total de gramos de huevos obtenidos por hembra fue de $1.03 \times 10^5 \pm 4.7 \times 10^3$ g. El promedio de gramos de huevos por cada kilogramo de hembra fue de 67.1±31 g y el número de huevos por gramo fue de 1.536±10. La fecundidad relativa y absoluta, estimada a partir de los huevos obtenidos por un único estrujamiento, fue de $1.03 \times 10^5 \pm 4.7 \times 10^3$ y de $1.61 \times 10^5 \pm 8.1 \times 10^4$ ovocitos, respectivamente (Tabla 1). USECHE; HURTADO; CALA (1993) estimaron la fecundidad (F) de *B. siebenthalae* en 2.36×10^5 ovocitos, en una hembra de 2.4 kg y PARDO-CARRASCO *et al.* (1999) reportaron una fecundidad absoluta de $1.12 \times 10^5 \pm 4.5 \times 10^4$ huevos.

Ninguna de las hembras inducidas con mGnRH-a en implantes desovó. En peces del género *Brycon*, hasta el momento no ha habido respuesta positiva con el análogo en solución acuosa, al parecer, no es suficiente para inducir la ovulación (PARDO-CARRASCO *et al.*, 1998, 1999; RAMOS y MENDOZA, 1997; HONCZARYK, 1997). Son varios los factores que pueden haber afectado este hecho, la dosis, el tipo de análogo empleado, la presencia de factores inhibidores desconocidos, como es el caso de la dopamina en ciprínidos (HARVEY y CAROLSFELD, 1993), el tiempo de vida del análogo en el pez y otros más. La posibilidad de que la respuesta negativa se deba al tipo de análogo empleado, se documenta en los resultados de las investigaciones de KOBAYASHI *et al.* (1997) quienes concluyen que en los peces existen diferentes tipos moleculares de GnRH y muchos tipos de neuronas GnRH en el cerebro y que se desconoce cual de estos tipos y neuronas actúan en las actividades reproductivas. Experimentos en salmón y goldfish sugieren que la población de neuronas GnRH, ubicadas en el telencéfalo ventral y en el hipotálamo, regulan la liberación de GtH, y que las

GnRH originadas en la terminación neuronal no son esenciales en la maduración gonadal y ovulación, además que la función de otras neuronas de GnRH es desconocida.

Los peces teleósteos no tienen un sistema portal hipotálamo-hipofisiario, a cambio tienen fibras nerviosas GnRH que terminan en la hipófisis gonadotropa (MUSKE, 1993; PETER *et al.*, 1990; KAH *et al.*, 1993) y como consecuencia, los GnRHs están presentes en el cerebro, así como en los extractos de pituitaria (YU; SHERWOOD; PETER, 1988; KING *et al.*, 1990b). Sin embargo, en un número de teleósteos, una de las formas de GnRH encontradas en el cerebro no se detecta en la glándula pituitaria (POWELL *et al.*, 1994; SOMOSA *et al.*, 1994; AMANO *et al.*, 1992). En estos peces, un GnRH de pollo (cGnRH-II), el cual está presente en todos los teleósteos estudiados hasta ahora (POWELL *et al.*, 1994; SHERWOOD; LOVEJOY; COE, 1993), está restringido al cerebro. Esta distribución de los diferentes GnRHs hace pensar que tienen funciones diferentes. Estudios *in vivo* sobre los factores liberadores de hormonas en el catfish africano por parte de GOOS *et al.* (1997) concluyeron que cGnRH-II tiene una potencia secretora de gonadotropinas 100 veces mayor que el GnRH de catfish (cfGnRH) y que la presencia de ambos en la glándula pituitaria de catfish africano tiene un efecto modulador de la actividad liberadora de GtH. Estos resultados permiten ver que la situación no es sencilla y que son varios los factores que afectan el desempeño de la hormona empleada. Uno de los más importantes es el desconocimiento de los factores liberadores de gonadotropinas en el yamú, sus diferentes formas, sus sitios de acción y la labor que realizan.

Como reporta TAMARU *et al.* (1988), los puntos críticos en la utilización del mGnRH-a están aún sin resolver en esta especie. Conocer el proceso de

maduración gonadal es vital para acertar el momento ideal de inducción con GnRH-a, así como determinar la dosificación mínima efectiva, el tipo de análogo y la vía de aplicación es esencial.

Conclusiones

Bajo condiciones especiales de manejo, domesticación, el yamú responde a los tratamientos hormonales con EPC, sin embargo, el porcentaje de éxito de la inducción con esta hormona aún es bajo, comparado con otras especies neotropicales mejor conocidas.

Es prematuro concluir que el yamú no responde positivamente a la ovulación y al desove, con mGnRH-a bajo los protocolos de aplicación empleados. Se recomienda continuar este tipo de ensayo para definir dosis óptimas, análogos eficientes y la mejor vía de aplicación.

Agradecimientos

Los autores desean expresar sus agradecimientos al Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos, Villavicencio (Colombia) por el apoyo institucional y económico para la realización del experimento. De igual forma, agradecen a los revisores anónimos su contribución en la mejoría del texto.

Referencias Bibliográficas

- ANDRADE-TALMELLI, E.F.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J.R. 1999 Fator de condição relativo (Kn): um critério para selecionar fêmeas de piabanha *Brycon insignis* (STEINDACHNER, 1876) (Pisces: Bryconidae), para indução reprodutiva. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 25: 95-99.
- ALMENDRAS, J.M.; DUEÑAS, C.; NACARIO, J.; SHERWOOD, N.M.; CRIM, L.W. 1988 Sustained hormone release. III. Use of gonadotropin releasing hormone analogues to induce multiple spawnings in sea bass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 74: 97-111.
- AMANO, M.; AIDA, K.; OKUMOTO, N.; HASEGAWA, Y. 1992 Changes in salmon GnRH and Chicken GnRH-II contents in the brains and pituitary, and GTH contents in the pituitary in female masu salmon, *Oncorhynchus masou*, from hatching through ovulation. *Zool. Sci.*, 9: 375-386
- CAROLSFELD, J.; SHERWOOD, N.M.; KREIBERG, H.; SOWER, S.A. 1988 Induced sexual maturation of herring using GnRH "quick release" cholesterol pellets. *Aquaculture*, 70: 169-181
- COOK, A.F. y PETER, R.E. 1980 The effect of temperature on the clearance of intraperitoneally-injected gonadotropin in the goldfish *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 19: 275-285
- CRIM, L.W.; SHERWOOD, N.M.; WILSON, C.E. 1988 Sustained hormone release. II. Effectiveness of LHRH analog (LHRHa) administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout. *Aquaculture*, 74: 87-95.
- DUAN, C. y HIRANO, T. 1991 Plasma kinetics of growth hormone in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 95: 179-188.
- GOOS, H.J.; BOSMA, P.T.; BOGERD, J.; TENSEN, C.P.; LI, K.W.; ZANDBERGEN, M.A.; SCHULTZ, R.W. 1997 Gonadotropin-releasing hormones in the African catfish: molecular forms, localization, potency and receptor. *Fish Physiol. Biochem.*, 17: 45-51.
- HARVEY, B. y CAROLSFELD, J. 1993 *Induced breeding in tropical fish culture*. Ottawa: IDRC. 144p.
- HONCZARYK, A. 1997 Effectiveness of an LHRH analogue for the induced spawning of matrinxã *Brycon cephalus*. In: SYMPOSIUM INTERNATIONAL BIOLOGY OF TROPICAL FISHES, 6-9 oct., Manaus, Brasil, 1999. *Anais...* p.137.
- KAH, O.; ANGLADE, L.; LEPRÊTRE, E.; DUBORG, P.; DE MONBRISON, D. 1993 The reproductive brains in fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 11: 85-98.
- KING, J.A.; DUFOUR, S.; FONTAINE, Y.A.; MILLAR, R.P. 1990 Chromatographic and immunological evidence for mammalian GnRH and chicken GnRH II in eel (*Anguilla anguilla*). *Brain and pituitary peptides*, 11: 507-514.
- KOBAYASHI, M.; AMANO, M.; KIM, M.H.; YOSHIURA, Y.; SOHN, Y. C.; SUETAKE, H.; AIDA, K. 1997 Gonadotropin-releasing hormones and gonadotropin in goldfish and masu salmon. *Fish Physiol. Biochem.*, 17: 1-8.
- LEE, C.S.; TAMARU, C.S.; KELLEY, C.D. 1986 Technique for making chronic-release LHRH-a and 17 α -methyltestosterone pellets for intra-muscular implantation in fishes. *Aquaculture*, 59: 161-168.

- MUSKE, L.E. 1993 Evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems. *Brains Behav. Evol.*, 42: 215-230.
- MYLONAS, C.Y. y ZOHAR, Y. 1995 Induced spawning of wild american *Alosa sapidissima* using sustained administration of gonadotropin-releasing hormone analog (GnRH_a). *Journal of the World Aquaculture Society*, 26(3): 240-251.
- PARDO-CARRASCO, S.C.; ARIAS, A.; ATENCIO-GARCÍA, V.; ZANIBONI FILHO, E.; VÁSQUEZ, W. 1998 Ensayos de reproducción inducida del yamú *Brycon siebenthalae* en los Llanos Colombianos. In: AQUICULTURA BRASIL' 98, 2 - 6 de nov., Recife, 1998. *Anais...* Recife. p.282-285.
- PARDO-CARRASCO, S.C.; ARIAS, A.; ATENCIO-GARCÍA, V.; ZANIBONI FILHO, E.; VÁSQUEZ, W. 1999 Experiencias de reproducción inducida en el Yamú *Brycon siebenthalae* en los llanos de Colombia. In: CURSO INTERNACIONAL DE ACUACULTURA, 2, 25-27 mar., Santa Fe de Bogotá, 1999. *Documentos...*
- PETER, R.E.; YU, K.L.; MARCHANT, T.A.; ROSENBLUM, P.M. 1990 Direct neural regulation of the teleost adenohypophysis. *J. Exp. Zool. Suppl.*, 4: 84-89.
- POWELL, J.F.; ZOHAR, Y.; ELIZUR, A.; PARK, M.; FISHER, W.H.; CRAIG, A.G.; RIVIER, J.E.; LOVEJOY, D.A.; SHERWOOD, N.M. 1994 Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 12081-12085.
- RAMOS, S.R. y MENDOZA, J.O.J. 1997 Utilização de análogos do LHRH, na indução do matrinxã *Brycon cephalus*. *B. Tec. CEPTA*, 10: 1-70.
- ROMAGOSA, E. 1998 *Desenvolvimento gonadal (morfologia; ultra-estrutura) e indução da reprodução do matrinxã, Brycon cephalus (Günther, 1869) em cativeiro Vale do Ribeira, São Paulo*. São Carlos. 218p. (Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar).
- SATO, N.; KAWAZOE, I.; SHIINA, Y.; FURUKAWA, K.; SUZUKI, Y.; AIDA, K. 1995 A novel method of hormone administration for inducing gonadal maturation in fish. *Aquaculture*, 135: 51-58.
- SHERWOOD, N.M.; CRIM, L.M.; CAROLSFELD, J.; WALTERS, S.M. 1988 Sustained hormone release. I. Characteristics of in vitro release of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH-a) from pellets. *Aquaculture*, 74: 75-86.
- _____; LOVEJOY, D.A.; COE, I.R. 1993 Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocr. Rev.*, 12(2): 241-254.
- SOMOSA, G.M.; STÉFANO, A.; DÉRAMO, J.L.; CANOSA, L.F.; FRIDMASN, O. 1994 Immunoreactive GnRH suggesting a tirad form of GnRH in addition to cIIGnRH and sGnRH in the brains and pituitary gland of *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 94: 144-152.
- TAMARU, C.S.; LEE, C.S.; KELLEY, C.D.; BANNO, J.E.; HA, P.Y.; AIDA, K.; HANYU, L. 1988 Characterizing the stage of maturity most receptive to an acute LHRH-a therapy for inducing milkfish *Chanos chanos* to spawn. *Aquaculture*, 74: 147-163.
- USECHE, C.; HURTADO, P.; CALA, H. 1993 Sobre la ecología de *Brycon siebenthalae* y *Milossoma duriventris* (Pisces: characidae) en el río Cafre, Orinoquia. *Caldasia*, 17: 341-352.
- WOYNAROVICH, E. y HORVATH, L. 1983 *A propagação artificial de peixes de águas tropicais- Manual de extensão*. FAO/CODEVASF.
- YU, K.L.; SHERWOOD, N.M.; PETER, R.E. 1988 Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides*, 9: 625-630.
- ZANIBONI-FILHO, E. y BARBOSA, N.D.C. 1996 Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. *Rev. Brasil. Biol.*, 56(4): 655-659.