

Nota Científica/ Short Communication

Análise da eficiência de diferentes hormônios na reprodução induzida do *Astyanax altiparanae* em ambiente laboratorial.

Autores: Aline Milani Fillus, Giuliana Ribeiro, Laryssa Chiste, Vitor Gomes Rossi

Resumo

Peixes reofílicos necessitam dos estímulos ambientais para realizar a reprodução. A utilização de técnicas de reprodução hormonal induzida surge como uma alternativa para que sejam desencadeados os estímulos necessários para a maturação final das gônadas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de 3 diferentes hormônios em peixes da espécie *Astyanax altiparanae*, o lambari-do-rabo-amarelo. O experimento foi composto de 4 tratamentos: HCG (gonadotrofina coriônica humana), GnRH α (hormônio liberador do hormônio gonadotrópico), extrato hipofisário de carpa (EHC) e um tratamento controle que utilizou solução de NaCl 0,9%. Cada tratamento com 2 fêmeas e 4 machos realizado em quadruplicata. Após a indução hormonal foram avaliados os seguintes parâmetros: período de latência (hrs), produção de ovos por fêmea, taxas de ovulação (%), fertilização (%) e eclosão (%). Destes parâmetros apenas os valores de período de latência apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), entre os tratamentos, o EHC teve valor mediano de 10,25 horas e o tratamento com HCG 8,25 horas. Já os outros parâmetros não diferiram entre-si ($p < 0,05$), como o número de ovos por fêmea EHC 7131,50, GnRH 612150, HCG 7175,25, e a taxa de sobrevivência para o EHC 93,97%, GnRH 94,64%, HCG 93,72%. Todos os hormônios foram eficientes na reprodução induzida do Lambari-do-rabo-amarelo.

Palavras chave: indução hormonal, peixes reofílicos, reprodução, bioindicador

Introdução

As interações entre fatores endógenos e ambientais são determinantes para o desencadeamento da reprodução em peixes (Rizzo & Bazzoli, 2014), principalmente em peixes reofílicos. Variações ambientais, como velocidade do fluxo de água, temperatura e fotoperíodo, são captadas por órgãos sensoriais, como a glândula pineal e por receptores cutâneos (Prötner, 2002; Korf, 2006). Esses órgãos convertem as informações ambientais em sinais eletroquímicos, que são propagados, através de neurônios, até o hipotálamo (Ikeseke & Negrão 2003), que, por sua vez, desencadeia a liberação de substâncias neurosecretoras, como o GnRH, que irá atuar na regulação da atividade hipofisária, e a hipófise, por sua vez, faz a liberação dos hormônios (GtH I e GtH II) que irão atuar diretamente nas gônadas (Crepaldi et al, 2006).

Em cativeiro, para que peixes reofílicos completem o seu ciclo de maturação e reprodução, é necessário fazer o uso de técnicas de reprodução artificial, como a indução hormonal (Bock & Padovani, 2000), que é um conjunto de técnicas que permitem que os peixes apresentem resposta endócrina analogamente ao que acontece em meio aquático natural (Andrade & Yasui, 2003). A indução hormonal pode ser realizada utilizando vários tipos de hormônios, dentre eles os extratos hormonais naturais, como extrato bruto hipofisário de carpa (EHCB) (Andrade, & Yasui, 2003), e também por produtos sintéticos, tais como o GnRH e LHRH (Porto-Foresti et al., 2010). Esses hormônios podem atuar de diferentes formas, como é o caso dos análogos de GnRH, que impedem que os hormônios se liguem aos receptores e eliminem o feedback negativo dos esteroides sobre a produção de gonadotrofinas.

Na aquicultura comercial, o uso desses hormônios na reprodução artificial deve levar em conta alguns fatores determinantes como: o preço e a dificuldade na sua obtenção, o estágio de desenvolvimento gonadal, a concentração do produto utilizado e os efeitos colaterais associados (Mehdi & Mousavi, 2011). Um dos peixes comerciais é o lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae*, uma espécie naturalmente encontrada na região sul do Brasil, muito comum nos rios e córregos da bacia do alto rio Paraná (Garutti e Britski 2000) e é considerada uma opção para a produção em escala comercial por suas características biológicas, tais como, alta prolificidade, reprodução parcelada, rusticidade e fácil manejo (Porto-Foresti et al., 2001). Além disso os

peixes do gênero *Astyanax* têm sido utilizados como isca-viva (Metzener et al., 2004), para consumo humano, como larvófagos no combate às larvas de pernilongos (Sato et al., 2006), ou ainda como modelo biológico em ensaios laboratoriais (Santana et al., 2015) e também como bioindicador de contaminação ambiental (Silva et al. 2009; Dal Pont, 2012).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta endócrina da indução hormonal, utilizando três diferentes hormônios em peixes da espécie *Astyanax altiparanae*.

Material e Métodos

Origem dos peixes e manutenção dos reprodutores

Os animais utilizados no experimento foram adquiridos, ainda na fase juvenil, na Central de Abastecimento do Paraná (CEASA) e mantidos, durante dois anos, em tanques de 800 L de capacidade útil, instalados em uma estufa agrícola na Universidade Federal do Paraná, Brasil. Os peixes eram alimentados *ad libitum* duas vezes ao dia e mantidos em água com temperatura controlada em 25 °C.

Tratamentos e estrutura física do experimento

Os experimentos foram realizados através de delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos e quatro repetições cada. Foram testados três tratamentos hormonais a base de: i) gonadotrofina coriônica humana (Vetecor® 5000U.I, fabricado pelo laboratório Calier, Espanha); ii) hormônio liberador de gonadotrofina (Profertil® 500µg, Fabiani, Brasil) e iii) extrato diluído de hipófise de carpa (Jardim de Minas, Brasil); além de um grupo controle negativo (NaCl 0,9%).

Em cada tratamento utilizaram-se duas fêmeas e quatro machos por réplica. Os animais foram mantidos em tanques-rede de nylon, com dimensões de 25 x 25 x 20 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente) e malha com abertura de 3 mm, posicionados no interior de aquários retangulares, com 30 L de capacidade útil cada.

Para manutenção da qualidade da água durante os experimentos, grupos de quatro aquários eram conectados entre si e a um sistema externo de filtração física e biológica, com volume útil de 100 L. Cada sistema era mantido sob aeração e iluminação constantes; recirculação da água, promovida por uma bomba submersa (SB-2000, Sarlobetter, Brasil); e sob temperatura controlada em 25 °C, mantida através de um aquecedor de 300 W (H-606, Hopar, China) e de um sistema de climatização da sala de experimentos.

Indução

Os animais utilizados foram previamente selecionados dos tanques de manutenção de reprodutores; pesados, utilizando-se uma balança eletrônica com precisão de $\pm 0,001\text{g}$ (AUY220, Shimadzu, Filipinas); e tiveram seus comprimentos padrão aferidos com o auxílio de um paquímetro universal 200 mm (Vonder, Brasil). Os peixes eram mantidos individualmente em beakers de 1 L, contendo 800 ml de água, até que todos os indivíduos de um mesmo tratamento fossem pesados e que fosse feito o cálculo das doses individuais de hormônio a serem aplicadas. A aplicação foi feita na base da nadadeira peitoral, com o uso de seringas de 1 ml e volume máximo aplicado de 0,3 ml por animal.

Avaliação da ovulação, fertilização e eclosão

Logo após a indução, os animais foram transferidos para os tanques-rede presentes em cada aquário. Seis horas após este processo, os aquários passaram a ser supervisionado a cada hora, para verificação da ocorrência de desovas e determinação do período de latência (tempo decorrido entre a indução e a ovulação). Quatro horas após a ovulação, os ovos e ovócitos foram coletados e pesados. Para padronização da pesagem, os ovos/ovócitos eram colocados em um puçá previamente umedecido e tarado. Depois de realizada a pesagem, uma amostra desse material era coletada, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, e pesada. Em seguida, os ovos/ovócitos presentes nestas amostras eram contabilizados para determinação, através de regra de três, da ovulação média de cada fêmea em cada aquário.

$$T_o = \frac{Na}{Pa} \times \frac{Pt}{Nf}$$

To = Ovulação média por fêmea (número de ovos/fêmea);

Na = número de ovos/ovócitos da amostra separada do total coletado de cada aquário;

Pa = peso da amostra (g);

Pt = Peso total de ovos/ovócitos coletados de cada aquário (g);

Nf = Número de fêmeas de cada tratamento

Ainda durante esta etapa, foram coletados 100 ovos/ovócitos de cada tratamento e os mesmos foram avaliados em um microscópio estereoscópico para quantificação da taxa de fertilidade. A constatação de fecundação era feita pela observação do estágio embrionário de mórula, sendo necessária a presença de ao menos duas células no embrião.

$$Tf = \left(\frac{Nf}{No} \right) * 100$$

Tf = Taxa de fertilidade observada em cada tratamento (%)

Nf = Número de ovos

No = Número de ovos/ovócitos coletados do total de cada tratamento.

Após este processo, foram separados 120 embriões de cada tratamento, que foram alocados em placas de cultivo celular (K12-006, Kasvi, China) contendo seis poços com capacidade de 10 ml cada. As placas foram armazenadas em uma incubadora vertical, tipo DBO microprocessada (Adamo®, Brasil), com temperatura controlada em 25 °C. Cada poço era povoado com dois embriões. Decorridas 24 horas, as larvas vivas em cada poço eram contabilizadas, para determinação da taxa de eclosão. Os embriões foram então analisados, sob microscópio estereoscópico, para identificação e quantificação de malformações, sendo essas classificadas de acordo com a natureza das anomalias encontradas.

$$Te = \left(\frac{Ne}{No} \right) * 100$$

Te = Taxa de eclodibilidade de cada tratamento (%).

Nl = Número de larvas eclodidas observadas em cada tratamento.

No = Número de ovos coletados do total de cada tratamento.

Análises estatísticas

Os dados biométricos foram analisados através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido pelo teste Tukey. As demais análises foram realizadas através do método não paramétrico pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando-se o *software* Statsoft Statistica^{MR} versão 12.0[®].

Resultados

Os valores medianos de peso inicial (g), peso final (g) e comprimento padrão (cm) obtidos para cada tratamento estão descritos na Tabela 1. Não foram identificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tratamentos. Os valores de peso inicial das fêmeas que variou entre 19,11 g (GnRH) e 22,01 g (EHC) e nos machos variou de 8,96 g (GnRH) a 10,26 g (EHC), também não diferiram ($p < 0,05$).

Tabela 1 – Variáveis biométricas (Mediana (mín-máx)) de exemplares de *Astyanax altiparanae* utilizados nos bioensaios em diferentes tratamentos aplicados para a indução hormonal.

Tratamentos	Hipófise (EHC)	Profertil (GnRH)	Vetcor (HCG)	Controle (NaCl)
N° fêmeas	8	8	8	8
Peso inicial (g)	22,01 (18,00 - 29,15)	19,11 (14,64 - 26,24)	19,22 (12,77 - 23,16)	20,08 (12,26 - 26,00)
Peso final (g)	19,29 (17,10 - 27,19)	17,92 (12,17 - 23,53)	17,03 (11,08 - 20,21)	20,12 (13,82 - 25,20)
Comprimento padrão (cm)	8,75 (7,80 - 9,80)	8,40 (7,60 - 9,00)	8,25 (7,50 - 9,30)	8,55 (7,90 - 9,90)
N° machos	16	16	16	16
Peso inicial (g)	10,26 (8,3 - 15,61)	8,96 (7,11 - 13,9)	9,78 (7,07 - 16,5)	9,86 (6,64 - 13,7)
Peso final (g)	9,79 (8,9 - 14,79)	8,22 (6,81 - 12,92)	10,05 (7,2 - 14,81)	9,01 (7,35 - 12,37)
Comprimento padrão (cm)	7,3 (6,5 - 8,4)	7,1 (6,5 - 8)	7,1 (6,3 - 8,4)	7,25 (6,5 - 8)

Na tabela 2 o tratamento controle (NaCl) a desova não ocorreu. O período de latência é a variável que demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$), entre o tratamento com hipófise (EHC) 10,25 horas e o tratamento com vetcor (HCG) 8,25 horas. Apesar de não haver diferença significativa ($p < 0,05$) entre os demais tratamentos, em número de ovos do tratamento EHC houve uma maior variação entre os valores de máxima e a mínima (4521,50 - 18525,00), diferente do tratamento com HCG em que esta variação foi muito menor (6665,00 - 8083,50).

Tabela 2 - Valores medianos (mín-máx) dos índices zootécnicos avaliados nos diferentes tratamentos de hormônios utilizados para a indução hormonal em *Astyanax altiparanae*.

Tratamentos	Hipófise (EHC)	Profertil (GnRH)	Vetcor (HCG)	*Controle (NaCl)
Período de latência (h)	10,25 ^a (9,00 - 10,50)	10 ^{ab} (9,00 - 10,00)	8,25 ^b (8,00 - 9,00)	-
N° ovos/ fêmea	7.131,50 (4.521,50 – 18.525,00)	6.121,50 (5.057,50 – 12.210,50)	7.175,25 (6.665,00 – 8.083,50)	-
N° ovos/ grama fêmea	318,95 (155,11 - 975,00)	330,84 (227,82 - 834,05)	375,07 (287,78 - 531,21)	-
Taxa de fecundidade (%)	60,91 (50,45 - 83,50)	79,72 (68,02 - 90,47)	67,63 (41,25 - 81,63)	-
Taxa de eclosão (%)	77,08 (67,50 - 85,83)	93,33 (79,17 - 100,00)	82,50 (77,50 - 90,00)	-
Taxa de sobrevivência pós – 24 hrs (%)	93,97 (55,42 - 96,12)	94,64 (92,63 - 100,00)	93,72 (81,19 - 95,70)	-

Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

* Dados não incluídos na análise estatística (mediana igual a zero e variância nula).

Discussão

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos, ao desovarem apresentaram redução de peso entre o peso final em comparação com o peso inicial, conforme a Tabela 1. Estas variações do peso na realização da indução hormonal, foram similares ao observado no trabalho de Barbieri (1982), em relação a amplitude de perda de peso em fêmeas maduras e pós desova.

Nenhuma fêmea do grupo controle desovou, mostrando a necessidade de um estímulo hormonal para realização da maturação final e desova. Já as fêmeas que receberam o tratamento hormonal, todas desovaram, Adebayo & Fagbenro (2004) induziram a ovulação e a desova artificial em *H. bidorsalis*, utilizando EBHC e HCG e também observaram que todas as fêmeas dos grupos testados nos diferentes tratamentos desovaram.

Apenas o período de latência diferiu entre os tratamentos, onde a hipófise apresentou maior tempo para desova em relação ao HCG, similar ao que ocorreu no trabalho de Scremin (2013) em que apresentou um período de latência maior na utilização da hipófise, na espécie piauçu (*Leporinus macrocephalus*) de 19,34 horas. A ovulação em peixes ocorre em média 10 a 14 horas (dependendo da temperatura) após completado o processo de indução hormonal (Andrade, Yasui 2003). Essa diferença entre tratamentos pode ser justificada por esses hormônios possuírem diferentes níveis de atuação para maturação das gônadas. O extrato de hipófise e o GnRH atuam no início da cadeia hormonal estimulando o peixe a produzir as próprias gonadotropinas e por isso, leva mais tempo até que chegue o estímulo nas gônadas, para posterior maturação e liberação dos gametas (Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004). Já a gonadotrofina coriônica humana (HCG) é um hormônio glicoprotéico de origem placentária que atua diretamente em níveis gonadais estimulando o desenvolvimento e função gonadal (Venturieri, 1999). Zohar & Mylonas (2001) comentam que as fases iniciais da gonadogênese são mais estimuladas por preparações de gonadotrofina (GtH) do que pelo uso do hormônio liberador de gonadotrofina GnRH.

Foi observada também uma tendência a obter uma maior quantidade de ovos por fêmeas ao utilizar o extrato hipofisário de carpa (EHC) em relação aos outros hormônios. Para Bock e Padovani (2000), na reprodução induzida do *Piaractus mesopotamicus*, o extrato bruto de hipófise de carpa chegou a respostas referentes à desova uma média alta de 1.200 ovócitos por grama de desova ao utilizar o mesmo hormônio. A média da taxa de fertilização dos ovos de fêmeas de *A. bimaculatus* corresponderam a 72% segundo Sato et. Al. 2006, sendo muito próximo ao valor encontrado no tratamento que utilizou a hipófise.

A relação das quantidades de ovos observada nos diferentes tratamentos foi maior se comparada à obtida em outros estudos com reprodução hormonal induzida, Sato 2006 encontrou número médio de ovócitos/g de ova 4.774 em peixes da espécie *Astyanax bimaculatus*, submetidos a hipofiseção. No jundiá (*Rhamdia quelen*) o valor de quantidade de óvulos foi alto e os valores alcançaram valores superiores a 100 g kg de peso vivo. Cada grama de óvulos é formado por, aproximadamente, 700-900 unidades (Carneiro 2008), representando metade dos valores encontrados neste experimento realizado, se mostrando um valor adequado em relação ao peso corporal.

Conclusão

Em todos os tratamentos com hormônios foi possível obter resposta, portanto o uso dos hormônios: gonadotrofina coriônica humana (Vetecor); hormônio liberador de gonadotrofina (Profertil) e extrato diluído de hipófise de carpa são eficientes para indução hormonal em *Astyanax altiparanae*.

Referências

ADEBAYO, O.T.; FAGBENRO, O.A. Induced ovulation and spawning of pond raised African giant catfish, *Heterobranchus biodorsalis* by exogenous hormones. **Aquaculture**, v.242, p.229-236, 2004.

ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo horizonte, v. 27, n. 2, p. 166-172, 2003.

AGOSTINHO, A.A.; MARQUESA, E.E.; AGOSTINHO, C.S.; ALMEIDA, D.A.; OLIVEIRA, R.J.; MELO, J.R.B. Fish ladder of Lajeado Dam: migrations on one-way routes? **Neotropical Ichthyology**, 5(2): 121-130. 2007.

BARBIERI, G.; SANTOS, M. V. R.; SANTOS, J. M. Época de reprodução e relação peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax*. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 17(7): 1057-1065, jul. 1982.

BOCK ock, C. L; PADOVANI, C. R. Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros. **Acta Scientiarum** vol. 22 n. 2:495-501, 2000.

CARNEIRO, P.C.F.; MIKOS, J. D. Gonadotrofina coriônica humana e do hormônio liberador de gonadotrofina como indutores da reprodução do jundiá. *Acta Scientiarum*, **Animal Sciences**, 2008.

CREPALDI, D. V. et al. Utilização de hormônio na reprodução induzida de surubim (*Pseudoplatystoma spp.*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3-4, p. 168-173, jul/dez. 2006

DAL PONT, G. Toxicidade do óleo diesel para o peixe *Astyanax altiparanae*. Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias. Curitiba/PR, **Universidade Federal do Paraná**. Mestrado em Ciências Veterinárias: 112. (2012).

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comum. Mus. Ciênc. Tecnol.**, PUCRS, Série Zoologia, Porto Alegre, v. 13, p. 65-88, 2000.

IKESEKI K. K.; NEGRÃO J. A. Controle neuroendócrino da reprodução de peixes teleósteos. **Revista de Ciências Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 11-20, 2003

KORF, H.M. The pineal organ In: Reinecke, M., Zaccone, G., Kapoor, B.G. (Eds.), **Fish Endocrinology**. Vol 2, Science Publishers, USA. 2006.

MEHEDI, Y., MOUSAVI, S.E. A review of the control of reproduction and hormonal manipulation and hormonal manipulations in finfish species. *Afr. J. Agric. Res.*, 6:1643-1650, 2011.

METZENER, A. F. M.; ROTTEORTE, J. A.; SENHORINI, J. A. Crescimento e sobrevivência final de juvenis de lambari (*Astyanax altiparanae*) sob diferentes densidades de estocagem, na fase alevino. In: **1º Congresso da Sociedade Brasileira de aquicultura e biologia aquática**, Vitória - ES – Brasil, resumo, p.203, 2004.

PRÖTNER, H.O., Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Phys. A.* 132, 739-761. 2002.

PORTO- FORESTI, F., CASTILHO-ALMEIDA, R.B., SENHORINI, J.A., FORESTI, F., Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: Baldisseroto, B., Gomes, L.C. (Eds.), **Espécies Nativas para piscicultura no Brasil. 2da edição**, Editoraufsm, Santa Maria, RS, pp. 101-115. 2010.

PORTO-FORESTI, F., OLIVEIRA, C., FORESTI, F., CASTILHO-ALMEIDA, R.B. Cultivo do lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. **Panorama da Aqüicultura** 11, 15-19. 2001.

RilZZO, E., BAZZOLI, N. Reprodução e embriogênese. In: Baldisserotto, B., Possebon, J.E., Criscuolo, E. (Eds.), **Biología e fisiología de peixes neotropicais de água doce**. FUNEP, pp. 265-284. 2014.

SILVA CA, OLIVEIRA RIBEIRO CA, KATSUMITI A, ARAUJO MLP, ZANDONÁ EM, COSTA SILVA GP, MASCHIO J, ROCHE H, SILVA de ASSIS HC. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 72(2):400-409. 2009.

SANTANA, C.A., ANDRADE, L.H.C., SÚAREZ, Y.R., YUKIMITU, K., MORAES, J.C.S., LIMA, S.M., Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy applied in fish scales to access environmental integrity: A case study of *Astyanax altiparanae* species. **Infrared Phys. Techn.** 72, 84-89, 2015.

SATO, Y., SAMPAIO, E.V., FENERICH-VERANI, N., VERANI, J.R. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Bras. Zool.** 23(1), 267-273. 2006.

SCREMIN BOSCOLO PEREIRA,T. Efeito de diferentes indutores hormonais sobre o processo de maturação final e ovulação de *Leoprinus macrocephalus*. **Universidade Estadual Paulista, 2013.**

VENTURIERI, R.; BERNARDINO, G. Hormônios na reprodução artificial de peixes. **Panorama da Aquicultura**, 1999.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo, [s.n.], p.45-73, 2004.

ZOHAR Y, MYLONAS CC. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. **Aquaculture**, v.197, p.99-136, 2001.