

# EFEITO DO hCG NA PRODUÇÃO DE SÊMEN DO CURIMBATÁ (*Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881)<sup>1</sup>

Emico Tahira Kavamoto<sup>2</sup>  
Massuka Yamane Narahara<sup>2</sup>  
Cleide S. R. Mainardes-Pinto<sup>3</sup>  
Elaine Fender de Andrade-Talmelli<sup>2</sup>  
Elizabeth Romagosa<sup>2</sup>  
Eduardo de Medeiros Ferraz<sup>2</sup>

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com HOAR (10), o hormônio luteinizante de mamíferos (LH) apresenta similaridade fisiológica com a gonadotrofina de peixes. Dessa forma, o hCG (gonadotrofina coriônica humana) vem sendo utilizado com sucesso na indução da reprodução de diversas espécies de peixes, dentre essas *Prochilodus scrofa*, descrita por CASTAGNOLLI e CYRINO (3), FENERICH-VERANI *et alii* (6) e NARAHARA *et alii* (16). Entretanto, no Brasil, ainda são escassas as pesquisas relacionadas com a ação de hormônios na maturação final das gônadas de machos.

Experimentos desta natureza foram realizados por BILLARD *et alii* (2), COURTOIS *et alii* (4) e SAAD e BILLARD (19), em *Cyprinus carpio*; e KOBAYASHI *et alii* (15), em *Carassius auratus*. Quanto às características seminais de teleósteos, encontram-se na literatura trabalhos

---

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 20.04.1995.

<sup>2</sup> Divisão de Pesca Interior - Seção de Biologia Aquática. Instituto de Pesca-CPA/SAA. Av. Francisco Matarazzo, 455.05031-900 Água Branca, São Paulo.

<sup>3</sup> Divisão de Pesca Interior - Estação Experimental de Piscicultura e Ranicultura de Pindamonhangaba - Instituto de Pesca-CPA/SAA.

de KAVAMOTO e FOGLI DA SILVEIRA (11), em *Rhamdia hilarii*; KAVAMOTO *et alii* (12) e KAVAMOTO *et alii* (14), em *Prochilodus scrofa*; e FOGLI DA SILVEIRA *et alii* (7), em *Piaractus mesopotamicus*.

Segundo DONALDSON e HUNTER (5) apud Hoar, reprodutores de diversas espécies criados em cativeiro apresentam espermição espontânea, mas o volume e a qualidade do sêmen podem ser aumentados com a utilização de hormônios apropriados. Com vistas a obter maximização da eficiência reprodutiva de exemplares de *Prochilodus scrofa*, pretende-se, com este trabalho, verificar a possibilidade de obtenção de sêmen dos mesmos reprodutores, 14 dias após receberem a primeira dose de hCG, e comprovar sua viabilidade pela realização de testes de fertilização.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo foi colhido sêmen de reprodutores de curimatá (*Prochilodus scrofa*) com três anos de idade, provenientes de reprodução induzida e criados em sistema de cultivo semi-intensivo, na Estação Experimental de Piscicultura e Ranicultura de Pindamonhangaba, Instituto de Pesca, São Paulo.

Em outubro de 1992, 50 machos produzindo sêmen foram transferidos do tanque de cultivo para o laboratório e, a seguir, anestesiados com solução de clorobutanol, a 3%, para obtenção dos dados de comprimento total (cm) e peso total (g). Estes exemplares foram marcados com número de registro, por perfuração na região anterior ao primeiro raio da nadadeira dorsal, e, posteriormente, colocados em tanque de terra com 400 m<sup>2</sup> e renovação de água de 3 a 4 l/min.

Decorridos 14 dias, 40 reprodutores foram retirados do tanque e levados até o laboratório, onde foram colocados 10 por caixa de cimento-amianto de 1.000 litros, contendo água corrente e aeração constante. O sêmen de cada reprodutor foi obtido por compressão do abdômen após o poro urogenital ser devidamente seco e limpo. Este sêmen foi colhido em seringas de vidro. Após a colheita, cada reprodutor recebeu a primeira injeção de hCG (Pregnyl, Organon do Brasil), por via intramuscular, na dose de 5 UI/g de peso vivo. Após 16 horas da primeira injeção hormonal colheu-se, novamente, o sêmen de cada peixe que, em seguida, foi transportado de volta ao tanque de origem. Decorridos 14 dias, repetiu-se o experimento com a aplicação da segunda dose hormonal (5 UI/g) e a colheita do sêmen foi realizada antes e após 16 horas da indução.

Como medida preventiva contra doenças, a cada manuseio, os peixes foram mergulhados por 1 minuto em solução salina, a 3%.

Após a leitura do volume de sêmen, foram avaliadas as seguintes

características: a) motilidade direta subjetiva realizada sob microscopia de contraste de fase (400x), com a mistura de uma gota de sêmen com duas gotas de solução de bicarbonato de Na, a 1%, sobre uma lâmina; b) percentagem de espermatozóides vivos e mortos, identificados pela coloração diferencial de acordo com FRIBOURGH (8); e c) concentração espermática, obtida por contagem em câmara hematimétrica de Neubauer "Improved".

O teste de fertilização foi realizado utilizando-se 10 machos que receberam dose única de hCG e outros 10 que receberam duas doses.

As fêmeas estocadas em tanque de cultivo de 500 m<sup>2</sup> (densidade = 1 peixe/m<sup>2</sup>) foram selecionadas, baseando-se em observações anatômicas externas (ventre abaulado e papila urogenital avermelhada), associadas ao grau de desenvolvimento dos diâmetros dos ovócitos intraováricos, segundo FENERICH-VERANI *et alii* (6). Os óvulos de duas fêmeas foram retirados por extrusão, misturados cuidadosamente e a fertilização realizada a seco, utilizando-se 20 lotes de aproximadamente 200 óvulos cada, para 0,025 ml de sêmen por indivíduo. Em seguida, os ovos foram transferidos para miniincubadoras de PVC com 10 cm de diâmetro e 18 cm de altura, fechadas na extremidade inferior por uma tela de malha muito fina, as quais eram mantidas imersas em caixas de cimento-amianto de 1.000 litros, com água corrente à temperatura de 26,5°C. Em cada mini-incubadora foi colocada uma pedra porosa para oxigenação e movimentação dos ovos. A taxa de fertilização foi calculada quando o desenvolvimento embrionário atingiu a fase de blástula, na qual foi considerada a razão entre o número de óvulos fertilizados e o número total de óvulos, expressa em percentagem.

Para comparar a percentagem de motilidade espermática com a de espermatozóides vivos, obtida pelo método da coloração diferencial, foi empregado o teste de qui-quadrado, a 5% de significância.

A associação e a relação entre o volume de sêmen, a concentração espermática, o número total de espermatozóides antes e após a primeira e a segunda dose e a fertilização foram analisados (20) pela aplicação do modelo matemático definido por

$$Y_{ijk} = m + d_i + a_{(i)j} + P_k + e_{ijk}$$

em que

$m$  = média geral;

$d_i$ , com  $i = 1,2$ , é o efeito de doses;

$a_{(i)j}$ , com  $j = 1,2$ , é o efeito de aplicações dentro de doses;

$P_k$ , com  $k = 1,2,\dots,40$ , é o efeito de peixes; e

$e_{ijk}$  = erro experimental.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento reprodutivo de *P. scrofa*, como o da maioria dos peixes, é influenciado pela elevação da temperatura da água e da precipitação pluviométrica na região. Assim, no mês de outubro de 1992, quando a temperatura da água estava em torno de 25°C, teve início a espermição dos machos de curimatá, ocasião em que todos os peixes foram marcados.

Os valores médios e desvios-padrão de comprimento e peso total dos reprodutores foram 35,84 cm e 450,75 g, respectivamente (Quadro 1). Segundo GODOY (9), na natureza, os machos de *P. scrofa* iniciam a reprodução a partir do segundo ano de vida, com comprimento total entre 22,00 e 23,00 cm e peso total entre 110,00 e 130,00 g.

Os valores médios de volume de sêmen (ml), concentração espermática ( $10^6/\text{mm}^3$ ) e número total de espermatozoides ( $10^9$ ), obtidos pelos valores individuais de 40 reprodutores antes e após a primeira e a segunda dose de hCG, estão apresentados no Quadro 1, no qual se observa que o volume médio de 0,27 ml de sêmen, colhido antes da primeira dose de hCG, está próximo ao encontrado por OLIVEIRA *et alii* (18) em *Cyprinus carpio* (0,26 ml) e é superior ao obtido antes da aplicação da segunda dose hormonal (0,15 ml). Após a aplicação do hormônio ocorreu aumento do volume de sêmen, fato já observado por BILLARD *et alii* (2) em *Cyprinus carpio* e DONALDSON e HUNTER (5), apud HOAR, e KOBAYASHI *et alii* (15) em *Carassius auratus*. De acordo com estes últimos autores, a produção de sêmen após aplicação de hCG indica que o hormônio GTH (gonadotrofina) surge durante o período de indução, incluindo a espermição e a hidratação do sêmen no testículo. Após 16 horas da indução hormonal, os reprodutores produziram maior volume de sêmen, corroborando as afirmações de NGAMVONGCHON *et alii* (17) de que a produção de sêmen é mais elevada após 12 a 24 horas da aplicação hormonal. SAAD e BILLARD (19) mostraram que o efeito do estímulo hormonal é de curta duração, razão pela qual a colheita de sêmen deve ser realizada até 48 horas após a aplicação do hormônio, pois o volume diminui gradativamente após este período.

Os valores médios de motilidade espermática (94,16%) foram superiores aos obtidos para a mesma espécie por KAVAMOTO *et alii* (12) (89,0%); e a percentagem de células vivas (93,95%) está próximo à constatada por FRIBOURGH (8) (97,01%), para *Carassius auratus* (Quadro 1). Quando relacionados entre si, pelo teste do qui-quadrado, os resultados de motilidade espermática e de espermatozoides vivos, por coloração diferencial, demonstram não haver diferença significativa, a 5% ( $X^2=0,024$ ), concordando com os dados obtidos por KAVAMOTO *et alii*

QUADRO 1 – Médias e desvios-padrão das características biométricas e seminais de 40 reprodutores de curimatá (*P. scrofa*) antes e após a primeira e a segunda dose de hCG

Características	Nº de peixes	1ª dose (HCG)		2ª dose (hCG)	
		antes $\bar{x} \pm s$	após $\bar{x} \pm s$	antes $\bar{x} \pm s$	após $\bar{x} \pm s$
Comprimento total (cm)	40	33,84 ± 1,76	-	-	-
Peso total (g)	40	450,75 ± 56,31	-	-	-
Volume (ml)	40	0,27 ± 0,08	1,63 ± 0,55	0,15 ± 0,06	1,12 ± 0,52
Motilidade espermática (%)	40	94,63 ± 1,33	94,00 ± 2,03	93,75 ± 2,19	94,25 ± 1,81
Coloração diferencial(% vivos)	40	93,69 ± 1,32	94,54 ± 1,98	93,72 ± 1,75	93,84 ± 1,86
Concentração espermática (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	40	33,14 ± 1,64	23,87 ± 1,42	29,95 ± 1,46	18,73 ± 1,23
Número total de espermatozoides (10 <sup>9</sup> )	40	8,95 ± 2,86	38,91 ± 11,96	4,55 ± 1,73	20,23 ± 9,17

x = Valores médios.

s = Desvio-padrão.

(13), bem como com as observações de FRIBOURGH (8), de que a proporção de espermatozóides vivos e mortos apresenta estreita relação com a estimativa percentual subjetiva da motilidade espermática.

O valor médio da concentração espermática antes da primeira indução hormonal foi igual a  $33,14 \times 10^6$  por  $\text{mm}^3$ , valor próximo ao encontrado por KAVAMOTO *et alii* (12) para a mesma espécie ( $34,19 \times 10^6/\text{mm}^3$ ). Todavia, foi inferior ao descrito por KAVAMOTO *et alii* (11) em *Rhamdia hilarii* ( $66,53 \times 10^6/\text{mm}^3$ ). Após a primeira aplicação de hCG obteve-se valor médio igual a  $23,87 \times 10^6$  por  $\text{mm}^3$ , superior ao obtido por KAVAMOTO *et alii* (14) para *P. scrofa* capturado em ambiente natural e injetado ( $19,52 \times 10^6$  por  $\text{mm}^3$ ). Nota-se que este valor está bem próximo ao obtido neste trabalho, após a aplicação da segunda dose ( $18,73 \times 10^6$  por  $\text{mm}^3$ ) (Quadro 1).

Para analisar os contrastes entre as médias da concentração espermática foi aplicado o teste de Tukey, a 1 e 5% de probabilidade. Esse teste demonstrou que a concentração espermática antes das aplicações hormonais foi superior àquela obtida após a primeira e a segunda aplicação, e o valor encontrado após a primeira dose de hCG superou o da segunda ( $P < 0,01$ ) (Quadro 2). BILLARD *et alii* (1) e KAVAMOTO *et alii* (13) afirmam que, para truta arco-íris, a concentração espermática do sêmen colhido não é constante durante todo o período de espermição: é máxima na primeira colheita e atinge valores mais baixos nas últimas amostras.

QUADRO 2 – Resumo das análises de variância do volume de sêmen, concentração espermática e número total de espermatozóides, antes e após a primeira e a segunda dose de hCG

Causas de variação	G.L.	Q.M. volume	Q.M. concentração espermática ( $10^5$ )	Q.M. número total de espermatozóides ( $10^5$ )
Dose	1	4,00 **	7,28 **	37,95**
B/A 1	1	36,91 **	17,17 **	142,57**
B/A 2	1	18,50 **	24,28 **	49,14**
Peixe	39	0,12	0,05	0,05
Resíduo	117	0,15	0,04	0,06

\*\* ( $P < 0,01$ ).

Q.M. = Quadrado médio.

A = Dose.

B = Aplicação.

Durante o experimento, o número total de espermatozóides aumentou significativamente após a primeira e a segunda dose de hCG ( $P < 0,01$ ). Assim, os valores encontrados para o número total de espermatozóides (Quadro 1) corroboram aqueles apresentados por outros autores, que observaram, após a indução hormonal, aumento do volume de sêmen e também da fluidez, facilitando a fertilização de maior número de óvulos. Os resultados da análise de variância demonstraram que, para a motilidade, o número de ovos incubados e a taxa de fertilização, não há diferença significativa, a 5%, entre os valores obtidos para os peixes que foram injetados uma ou duas vezes com hCG, cujos valores médios e desvio-padrão estão apresentados no Quadro 3.

QUADRO 3 – Valores médios e desvios-padrão das características seminais e taxa de fertilização de 10 exemplares de curimatá (*P. scrofa*) que receberam dose única e 10 que receberam duas doses de hCG

Aplica- de hCG	Nº de peixes	Vol. (ml)	Concentração	Motilidade	Nº ovos	Taxa de
			espermática ( $10^6/\text{mm}^3$ )	(%)	incubados	fertilização (%)
			x ± s	x ± s	x ± s	x ± s
1 dose	10	0,025	23,20 ± 1,98	94,9 ± 1,54	208 ± 5,1	95,5 ± 0,95
2 doses	10	0,025	20,80 ± 1,66	94,3 ± 1,56	211 ± 4,3	94,8 ± 1,58

x = Média.

s = Desvio-padrão.

Com estes resultados pode-se sugerir que machos de *Prochilodus scrofa* podem ser induzidos pela segunda vez (após 14 dias), sem qualquer prejuízo para o desempenho de sua atividade reprodutiva, não sendo evidenciada a morte de nenhum exemplar durante o período experimental.

#### 4. CONCLUSÕES

1) O volume de sêmen dos reprodutores após aplicação hormonal (hCG) foi superior ao obtido antes da aplicação e o obtido com dose única de hormônio superou aquele obtido com duas doses.

2) As concentrações espermáticas foram mais elevadas antes das aplicações de hormônio, quando comparadas às obtidas após as aplicações.

3) Após as aplicações hormonais, o número total de espermatozóides foi significativamente maior que antes das aplicações.

4) A taxa de fertilização não apresentou diferença significativa entre as duas aplicações hormonais, demonstrando ser possível o aproveitamento dos mesmos reprodutores por duas vezes durante o período reprodutivo.

## 5. RESUMO

Este estudo teve como objetivo conhecer o desempenho de 40 reprodutores de curimatá (*Prochilodus scrofa*) com três anos de idade, antes e após a primeira e a segunda aplicação de hCG (gonadotropina coriônica humana), bem como verificar a viabilidade das células espermáticas, pelo teste de fertilização de machos que receberam uma ou duas doses hormonais. Foi colhido sêmen de exemplares criados em ambiente confinado na Estação Experimental de Piscicultura e Ranicultura de Pindamonhangaba, Instituto de Pesca, São Paulo, durante o período reprodutivo de 1992. Os reprodutores receberam duas injeções de hCG, sendo cada dose de 5 UI/g de peso vivo, com intervalo de 14 dias. O sêmen foi colhido antes e após 16 horas das induções hormonais. O valor médio do volume do sêmen antes da indução hormonal foi igual a 0,21 ml e após, 1,38 ml. Pela análise de variância verificou-se que a concentração espermática foi significativamente superior ( $P < 0,01$ ) antes da aplicação hormonal e o valor obtido após a primeira dose de hCG foi superior àquele após a segunda ( $P < 0,01$ ). Os valores médios das taxas de fertilização, utilizando sêmen de reprodutores que receberam duas doses de hCG, não diferiram significativamente daqueles que foram injetados com dose única

## 6. SUMMARY

(EFFECT OF hCG ON SEMEN PRODUCTION OF CURIMBATÁ  
(*Prochilodus scrofa*, STEINDACHNER, 1881))

The purpose of this experiment was to study the performance of 40 three year old males of *Prochilodus scrofa* (Pisces, Prochilodontidae) reared in confined conditions in Estação Experimental de Piscicultura e Ranicultura de Pindamonhangaba, Instituto de Pesca, SP. The seminal characteristics in the breeding season of 1992, before and 16 hours after the first and the second hormonal induction with injections of hCG (human chorionic gonadotrofin) in a dose of 5 IU per gram of total weight were studied. Mean values of semen volume collected before hormonal induction was 0.21 ml and after, 1.38 ml. Through analysis of variance it was verified that spermatic concentration was significantly higher ( $P < 0.01$ ) before hormonal application and that after the first dose was higher



than that after the second one. There were no statistical differences between males receiving 1 dose or 2 of hCG concerning fertilization.

## 7. AGRADECIMENTOS

Ao Pesquisador Benedicto do Espírito Santo de Campos, pela análise estatística, e aos funcionários de apoio à pesquisa da Seção de Biologia Aquática e da Estação Experimental de Piscicultura e Ranicultura de Pindamonhangaba, do Instituto de Pesca.

## 8. LITERATURA CITADA

1. BILLARD, R.; BRETON, B. & JALABERT, B. La production spermatogénétique chez la truite. *Ann. Biol. Ann. Bioch. Biophys Paris*, 11(2): 199-212.1971.
2. BILLARD, R.; CHOISIS, J. P. & REINAUD, P. Stimulation of spermiation in carp in response to LH-RH and D.Ala-LH-RH ethylamide. *Aquaculture* 35(2): 173-176.1983.
3. CASTAGNOLLI, N. & CYRINO, J. E. Desova induzida do curimatá *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Ciência e Cultura* 32(9): 1245-1253.1980.
4. COURTOIS, F.; TAKASHIMA, F. & BILLARD, R. Stimulation of spermiation following repeated injection of carp pituitary homogenates in the carp. *Bull. Jap. Soc. Sc. Fish.* 52(6):995-997. 1986.
5. DONALDSON, E. M. & HUNTER, G. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. & DONALDSON, E.M.(ed.). *Fish Physiology*. New York, Academic Press,1983, v. 9, p.351-403.
6. FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H. M. & NARAHARA, M. Y. The size composition of the eggs of curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, induced to spawn with human chorionic gonadotropin (HCG). *Aquaculture*, 42(1):37-41.1984.
7. FOGLI DA SILVEIRA, W. F.; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. M.; RAMOS, S. M. & SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1881, proveniente de reprodução induzida. *Bol. Inst. Pesca*, 17(único):1-13. 1990.
8. FRIBOURGH, J. H. The application of a differential staining method to low temperature studies on goldfish spermatozoa. *The Progressive Fish Culturist*, 28(4):227-231. 1966.
9. GODOY, M. P. de. *Peixes do Brasil: sub-ordem Characoidei, Bacia do Rio Mogi - Guassu*. Piracicaba, Editora Franciscana, 1975. v. 4, p.687-696.
10. HOAR, W. S. Reproduction, In: HOAR, W.S. & RANDALL, D. J.(ed.). *Fish Physiology*. London, Academic Press, 1969.Vol. 3 , p. 1-72.
11. KAVAMOTO, E. T. & FOGLI DA SILVEIRA, W. F. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. *Bol. Inst. Pesca*,13(1): 95-100. 1986.
12. KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W. F. & GODINHO, H. M. Características seminais do curimatá *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881. *Bol. Inst. Pesca*,13(2):45-50.1986.
13. KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W. F.; RIGOLINO, M. G. ; TABATA, Y. A. & CAMPOS, B.E.S. Produção espermática e teste de fertilização do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons no primeiro ciclo reprodutivo. *Bol. Inst. Pesca*,

- 14(único):51-62.1987.
14. KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W. F.; GODINHO, H. M. & ROMAGOSA, E. Fertilização em *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. *Bol. Inst. Pesca*, 16(1):29-36. 1989.
  15. KOBAYASHI, M.; AIDA, K. & HANYU, I. Effects of HCG on milt amount and plasma level of steroid hormones in male gold fish. *Bull. Jap. Soc. Sc. Fish.* 52(4):755-756.1986.
  16. NARAHARA, M. Y.; ROMAGOSA, E.; KAVAMOTO, E.T.; ANDRADE, E. F. ; CESTAROLLI, M.A. & GODINHO, H.M. Desempenho de reprodutores de curimatã, *Prochilodus scrofa*, em condições de cultivo semi-intensivo com diferentes taxas de adubação orgânica. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO DE PESCA, 1, São Paulo, 1992. Anais, 1992, São Paulo, Inst. Pesca, p. 43.
  17. NGAMVONGCHON, S.; KOK, L. Y & TAKASHIMA, F. Changes in endocrine profiles and spermiation response in carp after LH-RH analogue injection. *Bull. Jap. Soc. Sc. Fish*, 53(2): 229-234. 1987.
  18. OLIVEIRA, J. C. F., BARNABÉ, V. H ; FOGLI DA SILVEIRA, W.; SOARES, H. A.; FREITAS, E.A.N. & KAVAMOTO, E.T. Características seminais da carpa (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758).*Braz.J.Vet.Res.Anim.Sci.*, 28(1): 81-87.1991.
  19. SAAD, A. & BILLARD, R. Spermatozoa production and volume of semen collected after hormonal stimulation in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 65(1):67-77.1987.
  20. SNEDECOR , G.W. & COCHRAN, W.G. *Métodos estatísticos*. México, Continental, 1980. 703 p.