

Indução da desova de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizando eCG E EBHC¹

Gilmara Junqueira Machado Pereira²
Luis David Solis Murgas²
Juliana Milan De Aquino Silva²
Aléssio Batista Miliorini²
Priscila Vieira Rosa Logato³
Daniele De Lima²

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da gonadotropina coriônica equina (ECG) e do extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) combinados, ou não, na indução da desova de curimba. Foram testados três tratamentos hormonais, em duas doses, com intervalo de 12 h: tratamento A (0,5 e 5,0 mg EBHC /kg), tratamento B (0,5 mg/kg de EBHC e 5,0 mg/kg de EBHC + 500 UI/kg de eCG) e tratamento C (0,5 mg/kg de EBHC e 500 UI/kg de eCG). Amostras de ovócitos foram coletadas às cinco e oito horas após a segunda aplicação hormonal para analisar a posição da vesícula germinativa e o diâmetro dos ovócitos. Foram avaliados o peso da desova e o índice gonadossomático. Não houve diferença entre o peso da desova das fêmeas induzidas pelos tratamentos A e B ($p > 0,05$). Na avaliação do diâmetro dos ovócitos, não teve diferença entre os tratamentos cinco horas ($p > 0,05$), enquanto às oito horas após a segunda aplicação hormonal os tratamentos B e C foram diferentes do tratamento A ($p < 0,05$). Na avaliação do posicionamento da vesícula germinativa, os tratamentos A e B foram diferentes do tratamento C ($p < 0,05$). Pode-se concluir que o eCG não se mostrou eficiente quando utilizado sozinho na segunda aplicação hormonal na indução da desova de curimba.

Palavras-chave: Desova, peixes, reprodução induzida.

ABSTRACT

Spawning induction of curimba (*Prochilodus lineatus*) using eCG and CPE

The objective of this work was to analyze the effect of equine chorionic gonadotropin (eCG) and carp pituitary extract (CPE), combined or not, in the induction of spawning in curimba. Three hormone treatments were carried out with two doses, in an interval of 12 h; treatment A (0.5 mg/kg of CPE and 5.0 mg/kg of CPE), treatment B (0.5 mg/kg of CPE and 5.0 mg/kg CPE + 500 IU/kg of eCG) and treatment C (0.5 mg/kg of CPE and 500 IU/kg eCG). Oocyte samples were collected, five and eight hours after the second hormone application, to analyze the position of the germinative vesicle and oocyte diameters. Weight of fish spawning and the gonadossomatic index were evaluated. There was no significant difference between the weight of spawning of female fish induced by the treatments A and B ($p > 0.05$). Evaluation of oocyte diameters showed no significant difference among the treatments five hours ($p > 0.05$), whereas

Recebido para publicação em maio de 2008 e aprovado em abril de 2009

¹ Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor. Financiada pela CAPES.

² Departamento de Medicina Veterinária – UFPA, campus universitário, caixa postal 37, Lavras-MG, lsmurgas@ufpa.br, gilmarajmp@yahoo.com.br

³ Departamento de Zootecnia – UFPA, campus universitário, caixa postal 37, Lavras-MG, priscila@ufpa.br

for the eight hours, after the second hormone application, treatments B and C were different from the treatment A ($p < 0.05$). The evaluation of the germinative vesicle position showed that the treatments A and B were different from treatment C ($p < 0.05$). Results of this work showed that the eCG was not efficient when used alone on the second hormone application in the induction of spawning in curimba.

Key words: fish, induced reproduction, spawning

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se observado uma intensificação do estudo da ictiofauna brasileira que revelou várias espécies promissoras para criação em pisciculturas, como a curimba (*Prochilodus lineatus*), que apresenta alta prolificidade, crescimento rápido, elevada rusticidade e é fonte de alimento para as espécies de peixes predadores (CEMIG/CETEC, 2000).

A curimba também é conhecida como curimatã, curimbatã ou papa-terra, é uma das espécies do gênero *Prochilodus* que possui ampla distribuição nas principais bacias hidrográficas da América do Sul, principalmente do Brasil (Reis *et al.*, 2003). Essa espécie era identificada na bacia do Alto Rio Paraná como *Prochilodus scrofa* Steindachner (1881). Castro & Vari (2003) consideraram esta espécie sinônimo de *Prochilodus lineatus*.

A reprodução da maioria dos peixes é sazonal, estando geralmente sincronizada com fatores ambientais que se adequam às necessidades metabólicas dos reprodutores, de tal forma que incrementa a viabilidade dos gametas e favoreçam o desenvolvimento inicial da prole (Vazzoler, 1996).

A curimba é uma espécie que realiza migração em massa, rio acima, na época de reprodução, de novembro a janeiro. O deslocamento de centenas de quilômetros afeta toda a fisiologia desses peixes, desencadeando processos essenciais para o preparo da reprodução. Nos viveiros de piscicultura, a privação desse comportamento migratório impede que esses peixes atinjam o preparo fisiológico para a reprodução. Com isso, faz-se necessária a indução hormonal da reprodução (Murgas *et al.*, 2003).

As técnicas de reprodução artificial de peixes são múltiplas e, segundo Woynarovich e Horváth (1989), a hipofiseção com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) é seguramente o método mais utilizado na indução artificial da reprodução de espécies de caráter reofílico.

Existem vários tipos de substâncias utilizadas para induzir a reprodução em peixes, conforme suas estruturas químicas agem segundo princípios diferentes. Além disso, a dose necessária de uma mesma substância varia de espécie para espécie (Baldisserotto, 2002).

As gonadotrofinas de mamíferos são facilmente obtidas no comércio e de baixo custo, apresentando-se como substâncias alternativas ao uso da hipófise de carpa para indução da reprodução em peixes de água doce. O eCG, também chamado PMSG (gonadotrofina séria de égua prenhe), é o único hormônio glicoprotéico que contém atividade de FSH e LH na mesma molécula (Hafez, 2004).

O presente trabalho analisou os efeitos sobre o peso da desova, diâmetro dos ovócitos e o posicionamento da vesícula germinativa (núcleo) dos ovócitos de curimba (*Prochilodus lineatus*) tratados com EBHC e eCG (Novormon 5000®), combinados ou não.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no período da piracema, entre os meses de novembro de 2005 e janeiro de 2006, na Estação Ambiental de Itutinga da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-CEMIG), no município de Itutinga-MG e no setor de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Foram selecionadas 25 fêmeas de curimba *Prochilodus lineatus* do plantel da EAI-CEMIG, mantidas em tanque de terra. Elas foram selecionadas para o experimento de acordo com as características reprodutivas citadas por Woynarovich & Horváth (1989). O processo de seleção é baseado em sinais externos que acompanham a maturação gonadal. As fêmeas aptas para a indução hormonal da desova apresentavam o abdômen desenvolvido e macio ao toque, papila urogenital proeminente e de coloração rosada ou avermelhada e o orifício genital ligeiramente aberto. Após a seleção, elas foram identificadas com fios de linha de cores diferentes, suturados na altura do primeiro raio da nadadeira dorsal. Durante a marcação, as fêmeas foram pesadas para se calcularem as doses hormonais a serem administradas, em seguida foram acondicionadas em aquários.

Os aquários de alvenaria utilizados para a manipulação possuíam capacidade de 2.000 litros, com temperatura em torno de 28 °C e renovação constante de água. No

momento da indução hormonal, os animais foram contidos dentro do aquário, sendo segurados na cabeça e no pedúnculo caudal e retirados parcialmente da água; em seguida, aplicou-se a dose hormonal utilizando seringa graduada de 1 mL, na base da nadadeira dorsal, por via intramuscular.

As fêmeas de curimba foram submetidas a três tratamentos diferentes quanto ao tipo de hormônio e à dosagem empregados: tratamento A: primeira dose de 0,5 mg/kg EBHC e segunda dose de 5,0 mg/kg de EBHC, sendo utilizados 14 animais; tratamento B: 1ª dose de 0,5 mg/kg de EBHC e a segunda dose de 5,0 mg/kg de EBHC + 500 UI/kg de eCG, foram utilizados 7 animais; e tratamento C: primeira dose de 0,5 mg/kg de EBHC e segunda dose de 500 UI/kg de eCG, foram utilizados quatro animais. As doses hormonais foram aplicadas com intervalo de 12 horas. O extrato bruto de hipófise de carpa foi preparado segundo metodologia da EAI-CEMIG descrita por Silva (2000). O NOVORMON® foi diluído segundo a prescrição do laboratório de fabricação.

A partir da segunda dose dos tratamentos hormonais, aferiu-se a temperatura da água dos aquários a cada hora com precisão de 1°C, para se determinar a hora/grau necessária para ocorrência da ovulação e consequente extrusão dos gametas.

Foram realizadas duas análises dos ovócitos de todas as fêmeas para se determinar o estágio de desenvolvimento ovocitário, sendo a primeira avaliação realizada cinco horas após a segunda aplicação hormonal e a segunda oito horas após a segunda aplicação hormonal. Foram coletadas amostras de ovócitos intraováricos, com auxílio de sonda uretral nº 8, introduzida pela papila urogenital.

Para a mensuração do diâmetro dos ovócitos, uma das amostras de ovócitos foi fixada em solução de Gilson (50 mL de álcool 60%, 440 mL de água destilada, 7 mL de ácido nítrico, 10 g de cloreto mercúrico - HgCl₂ e 9 mL de ácido acético glacial) por 30 minutos, e os ovócitos foram medidos (mm) com auxílio de ocular micrométrica (10x), sob microscópio óptico (40x).

Outra amostra foi fixada em líquido de Serra (60 mL de álcool 90 °GL; 30 mL de formalina; e 10 mL de ácido acético glacial) para a avaliação da migração da vesícula germinativa, a qual permitiu a visualização do núcleo, sendo o exame realizado após um minuto de fixação nessa solução, com auxílio de microscópio estereoscópico. Foram consideradas duas categorias de ovócitos: com núcleo em posição central e com núcleo em posição periférica.

A desova ocorreu entre oito e nove horas após a segunda aplicação hormonal; as fêmeas foram retiradas do aquário envolvidas em toalhas úmidas e apoiadas sobre uma espuma na mesa de manipulação. Em seguida, a papila

urogenital e a nadadeira anal foram secas com toalhas de papel, evitando o contato dos ovócitos com a água. Estes foram extruídos por meio de massagens manuais na parede celomática, no sentido crânio-caudal. A desova foi realizada em becker ou recipiente plástico previamente limpo e seco. Após a obtenção das desovas, essas foram pesadas para o cálculo do índice gonadossomático, de acordo com a seguinte relação: $IGS = \text{peso da ova} \times 100 / \text{peso corporal do animal}$ (Sato *et al.*, 2003).

Nas fêmeas que não desovaram no período de oito a nove horas após a segunda aplicação hormonal, procedeu-se à coleta de amostras de ovócitos intra-ováricos para posterior avaliação.

Nos parâmetros como migração da vesícula germinativa (núcleo), cinco e oito horas após a segunda aplicação hormonal foi adotado o teste de qui-quadrado. Para as variáveis como peso, peso da desova e diâmetro médio dos ovócitos cinco e oito horas após a segunda aplicação hormonal e índice gonadossomático (IGS) foram feitas análises de variância, considerando um experimento inteiramente casualizado com número diferente de repetições por tratamento. As médias foram comparadas pelo teste Tukey com um nível nominal de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se do programa Statistical Analyses System (SAS, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A desova das fêmeas induzidas ocorreu entre 224 a 252 horas-graus após a segunda aplicação hormonal, com temperatura de 28 °C; valor que se encontra na faixa de horas-graus para *Prochilodus sp* (Sato *et al.*, 2003).

Os valores médios de peso da desova, diâmetro dos ovócitos cinco e oito horas após a segunda aplicação hormonal e do índice gonadossomático das fêmeas de curimba que receberam diferentes tratamentos hormonais estão representados na Tabela 1. As fêmeas induzidas pelos tratamentos A (0,5 mg/kg de EBHC/5,0 mg/kg de EBHC) e B (0,5 mg/kg de EBHC/5,0 mg/kg de EBHC + 500 UI/kg de eCG) não apresentaram diferença ($P > 0,05$) entre o peso das desovas. Enquanto as fêmeas induzidas pelo tratamento C (0,5 mg/kg de EBHC/500 UI/kg de eCG) não desovaram, no período de oito a nove horas após a segunda aplicação.

O tratamento A (0,5 e 5,0 mg/kg de EBHC) foi utilizado como tratamento controle positivo, devido aos ótimos resultados obtidos com essa dosagem em reproduções anteriores no EAI-CEMIG. A dosagem é amplamente utilizada em várias espécies como curimba (*Prochilodus lineatus*), dourado (*Salminus brasilienses*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), piapara (*Leporinus obtusidens*), piracanjuba (*Brycon orbinyanus*), entre outras (Silva, 2000).

Neste experimento foram obtidos 100% de desova nas fêmeas tratadas com 0,5 e 5,0 mg/kg de extrato bruto de hipófise de carpa. Chen (2005) obteve 100% de desova em fêmeas tratadas com 6 mg/kg de extrato bruto de hipófise de carpa em *Takifugu ocellatus*. Por outro lado, Narahara *et al.* (2002), testando um método de indução da reprodução em pirapitinga (*B. opalinus*), utilizaram uma dosagem de 5 e 10 mg/kg de extrato bruto de hipófise de salmão, e apenas 48% das fêmeas desovaram. Szabo *et al.* (2002) obiveram 66,6% de fêmeas desovadas, utilizando 3 e 6 mg/kg de extrato bruto de hipófise de carpa na indução da ovulação de *Chondrostoma nasus*. Estes resultados demonstram que há grande variação na resposta à dose hormonal aplicada nas diferentes espécies de peixes.

Outro fator que se deve levar em consideração é a qualidade das hipófises para fins de indução hormonal em peixes, por ser dependente do grau de maturação em que se encontrava o peixe doador da hipófise (Woynarovich & Horváth, 1989; Harvey & Carolsfeld, 1993; Baldisserotto, 2002). Os hormônios sintéticos não apresentam dificuldade de padronização quanto à quantidade de gonadotropinas em sua composição, ao contrário da hipófise de peixes doadores. Por isso, várias pesquisas têm sido conduzidas com o intuito de testar substâncias alternativas para utilização nas técnicas de reprodução induzida em peixes. Não existem relatos na literatura científica sobre o uso da gonadotropina coriônica equina na indução da reprodução de peixes.

Segundo Woynarovich & Horváth (1989), a fase de pré-ovulação pode, geralmente, ser obtida facilmente administrando hCG, mas é difícil alcançar a plena ovulação por meio desse método na maioria dos peixes, somente aqueles que estão bem preparados e totalmente maduros para o tratamento com hormônio reagem à administração de hCG. Técnicos da CESP (1994), segundo Sallum (1999), obtiveram resultados positivos na indução da reprodução da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com uma dosagem de 0,5 mg de EBHC/kg na primeira aplicação e 4,5 mg de EBHC/kg juntamente com 3.000 UI de hCG/kg na dose decisiva. Resultados semelhantes ao observado neste experimento foram obtidos quando se utilizou 0,5 mg de EBHC/kg na primeira aplicação hormonal e 5,0 mg de EBHC/kg juntamente com 500 UI de eCG/kg na segunda aplicação hormonal, obtendo 100% de fêmeas desovadas.

Na avaliação do diâmetro dos ovócitos cinco horas após a segunda aplicação hormonal não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos testados (A: 1,36 mm; B: 1,39 mm; C: 1,29 mm). Os diâmetros médios dos ovócitos oito horas após a segunda aplicação hormonal, nos tratamentos B e C, foram diferentes estatisticamente ($P < 0,05$) do tratamento A (Tabela 1). O diâmetro dos ovócitos mensurados neste experimento foi inferior ao relatado por Vazzoler (1996) para *Prochilodus lineatus*, que foi de 1,45

Tabela 1. Valores do peso da desova (g), dos diâmetros médios dos ovócitos cinco e oito horas após a segunda aplicação hormonal (mm) e do índice gonadosomático – IGS (%)

Parâmetro	Tratamentos		
	A	B	C
Peso da desova	221,7a	213,5a	0 b
Diâmetro dos ovócitos cinco horas	1,36 a	1,39 a	1,29a
Diâmetro dos ovócitos oito horas	1,36 a	1,27 b	1,24b
IGS	12,8 a	13,8 a	0 b

Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

mm. Esse mesmo autor relatou que há tendência de variação do diâmetro de acordo com o comportamento reprodutivo, em que espécies migradoras de grande porte, como a curimba, têm diâmetro de ovócitos médios. O diâmetro dos ovócitos é um método rápido para confirmação do estágio de maturidade dos peixes (Vazzoler, 1981) e, por isso, é muito utilizado para a seleção de fêmeas reprodutoras.

O índice gonadosomático expressa a porcentagem que as gônadas representam do peso do corpo dos indivíduos e parece um indicador eficiente do estado funcional dos ovários (Vazzoler, 1996). Os valores para este parâmetro no presente estudo encontram-se abaixo da faixa apresentada por Sato *et al.* (2003), a qual variou de 14 a 26,2 para *Prochilodus sp.*

Na avaliação do posicionamento da vesícula germinativa (núcleo), os tratamentos A e B foram diferentes ($P < 0,05$) do tratamento C tanto na avaliação realizada às cinco horas quanto às oito horas após a segunda aplicação hormonal (Figura 1). Isso demonstra que as fêmeas dos tratamentos A e B estavam numa fase adiantada de maturação, provavelmente influenciadas pelos tratamentos.

O eCG possui atividade biológica semelhante tanto ao FSH quanto ao LH, porém predominantemente ao FSH (Hafez, 2004). Isso justifica a baixa eficiência na indução da desova nas fêmeas de curimba tratadas com a combinação

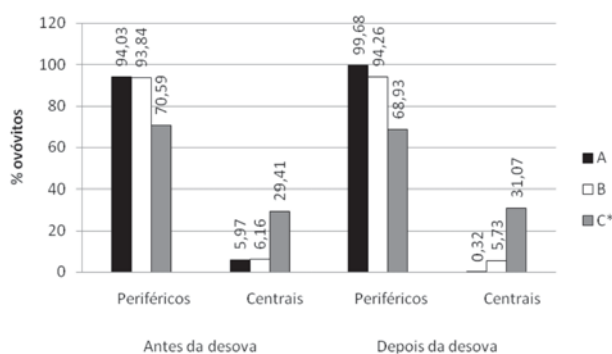


Figura 1. Proporções dos núcleos dos ovócitos cinco e oito horas após a segunda aplicação hormonal, em função do seu posicionamento, para cada um dos tratamentos testados.

* Diferente dos outros tratamentos pelo teste qui-quadrado.

do EBHC na primeira aplicação hormonal e eCG na segunda. Supõe-se que a utilização do eCG na primeira aplicação hormonal e EBHC na segunda poderá desencadear o processo de maturação e ovulação das fêmeas de curimba.

Na ovulação, os níveis de LH caem, indicando que as gonadotropinas não estariam diretamente ou totalmente envolvidas na indução da ovulação e que aparentemente dependeria da síntese de prostaglandinas, responsáveis pela ruptura da parede folicular dos ovócitos (Berndtson *et al.*, 1989). Isso comprova a eficiência do EBHC na indução da desova em peixes, por apresentar várias substâncias capazes de estimular todo o processo endócrino para a reprodução induzida.

CONCLUSÃO

Nas condições em que este experimento foi realizado pode-se concluir que a gonadotropina coriônica equina (eCG) não se mostrou eficiente quando não associada ao extrato bruto de hipófise de carpa na segunda aplicação hormonal, na indução da desova de curimba (*Prochilodus lineatus*).

AGRADECIMENTOS

À Estação Ambiental de Itutinga da Companhia Energética de Minas Gerais, pelo apoio na realização das coletas; e à Tecnopec, pela doação de hormônio.

REFERÊNCIAS

- Baldissotto B (2002) Fisiologia de peixe aplicada à piscicultura. Santa Maria, UFSM, 212p.
- Berndtson AK, Goetz FW, Duman P (1989) In vitro ovulation, prostaglandin synthesis and proteolysis in isolated ovarian components of yellow perch (*Perca flavescens*): Effects of 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and phorbol ester. *General and Comparative Endocrinology*, 75:454-465.
- Castro RMC & Vari RP (2003) Family Prochilodontidae. In: Reis R E, Kullander SO, Ferraris JR CJ Check list of the freshwater fisher of South and Central America. Porto Alegre, EDIPUCRS, p.742.
- Chen YF (2005) Induced ovulation and embryonic development of ocellated puffer, *Takifugu ocellatus*. *Journal Applied Ichthyology*, 21: 136-140.
- Companhia Energética de Minas Gerais. Fundação Centro Tecnológico De Minas Gerais. (2000) Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande. Belo Horizonte, CEMIG/CETEC, 144p.
- Hafez, ESE (2004) Reprodução Animal, 7ed. Barueri, Manole, 513p.
- Harvey B & Carolsfeld J (1993) Inuced breeding in tropical fish culture. Ottawa, IDRC, p.144.
- Murgas LDS, Viveiros ATM, Maria NA & Freitas RTF (2003) Reprodução/espécies próprias para a piscicultura. Lavras, UFLA/FAEPE, p.28.
- Narahara MY, Andrade-Talmelli EF, Kavamoto ET & Godinho HM (2002) Reprodução induzida da Pirapitinga-do-sul, *Brycon opalinus*, mantida em condições de confinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31: 1070-1075.
- Reis RE, Kullander SO & Ferraris JRCJ (2003) Check list of the freshwater fisher of South and Central America. Porto Alegre, EDIPUCRS, p.742.
- Sallum WB (1999) Reprodução das principais espécies de peixes. Lavras, UFLA/FAEPE, 74p.
- Sato Y, Fenerich-Verani N & Godinho HP (2003) Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco. In: Godinho HP & Godinho AL Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte, PUC Minas, p.275-289.
- SAS. SAS/STAT Software. (1995) Guide for personal computers. Cary, New York.
- Silva MOB (2000) Reprodução de peixes: princípios básicos de piscicultura. Itutinga, CEMIG, p. 28-25.
- Szabó T, Medguasszay C & Horváth L (2002) Ovulation induction in nase (*Chondrostoma nasus*, Cyprinidae) using pituitary extract or GnRH analogue combined with domperidone. *Aquaculture*, 203:389-395.
- Vazzoler AEAM (1996) Biologia da reprodução de peixes teleosteos: teoria e prática. São Paulo, SBI, 169 p.
- Vazzoler AEAM (1981) Manual de métodos par estudos biológicos sobre populações de peixes: crescimento e reprodução. Programa Nacional de Zoologia. Brasília, CNPq, 108p.
- Woynarovich E & Horváth L (1989) Propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília, FAO/ CODEVASF/CNPQ, 225p.