

Utilização do LHRH-a para indução à espermiacão e desova do Pacu-caranha, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887).

Evoy Zaniboni Filho

Depto. de Aquicultura/CCA/UFSC. Caixa Postal 476
88040-900 - Florianópolis - SC

Resumo

A utilização da hipófise para induzir a maturação final e ovulação/espermiacão de peixes é bastante conhecida e aplicada pelos piscicultores brasileiros, embora possam existir outros indutores hormonais que apresentem vantagens fisiológicas e econômicas. Este trabalho objetiva estabelecer a dosagem ideal de LHRH-a para induzir a reprodução de machos e fêmeas de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*), comparando com a técnica tradicional utilizada para este fim. A qualidade e quantidade dos gametas são avaliadas, bem como os custos de produção. Os melhores resultados foram obtidos com a aplicação de 16,5 μg de LHRH-a/kg de fêmea, em duas doses, e 7,0 μg de LHRH-a/kg de macho, com efeitos quali e quantitativos semelhantes aos observados no tratamento com EPC. A utilização de LHRH-a possui um custo 4,5 vezes menor.

Unitermos: Reprodução induzida, Pacu-caranha, *Piaractus mesopotamicus*.

Summary

Hypophysation to induce the final maturation and ovulation/spermiacation of fishes is very well-known and has been used by Brazilian fish

Projeto financiado pelo FUNPESQUISA (UFSC/93), com apoio executivo do convênio UFSC/EPAGRI

breeders, although there might be other hormonal inductors with physiological and economic advantages. This paper looks for the ideal dosage of LHRH-a to induce the final maturation and spawning in males and females of "pacu-caranha" (*Piaractus mesopotamicus*) comparing to traditional technique of induction. The quality and quantity of sperm and eggs are evaluated, as well as production costs. The best results were achieved with the use of 16.5 μg of LHRH-a/kg for females (two doses), and 7.0 μg of LHRH-a/kg for males, the effects being qualitatively and quantitatively similar to those observed in the traditional treatment with EPC. The use of LHRH-a yields a cost 4.5 times lower.

Key words: Induced breeding, "Pacu-caranha", *Piaractus mesopotamicus*, LHRH-a.

Introdução

A piscicultura mundial esteve restrita, durante muitos anos, ao cultivo de espécies de peixes que se reproduzissem em ambientes lênticos, como carpas e tilápias. Com o desenvolvimento da técnica de hipofiseção, após os anos 30, foi possível utilizar este procedimento para várias outras espécies de peixes (Donaldson e Hunter, 1983), inclusive para diversos grupos endêmicos do Brasil (Godinho e Godinho, 1986; Sato, 1989; Zaniboni Filho e Barbosa, 1991).

A hipofiseção, embora seja uma técnica bastante eficiente na indução à desova de peixes reofílicos, apresenta algumas desvantagens, de acordo com Donaldson e Hunter (1983), entre elas:

- Depende do sacrifício de grande quantidade de peixes adultos e sexualmente maduros para a retirada das hipófises;
- A hipófise possui, além do hormônio gonadotrópico necessário à indução gonadal, hormônios de crescimento e osmorreguladores, entre outros, o que causa elevado estresse nos indivíduos receptores, reduzindo a vida útil dos reprodutores.

Durante a década de 70, foram isolados alguns hormônios indutores à desova de peixes, como o LHRH (hormônio liberador do hormônio luteinizante), a partir de mamíferos. Esses hormônios foram utilizados igualmente com sucesso para a reprodução induzida de algumas espécies de peixes, porém a elevada dosagem necessária inviabilizou economicamente a

sua utilização. A produção sintética de alguns análogos do LHRH, como o [D-Ala 6, Pro 9 N^{Et}] LHRH (= LHRH-a, des-GLY, D-Ala 6) e o [D-Ser 6, Pro 9 N^{Et}] LHRH (= LHRH-a, des-GLY, D-Ser 6), possibilitou a obtenção de resultados positivos na indução à desova de diversas espécies de peixes brasileiros (Carolsfeld, 1989; Zaniboni Filho e Barbosa, 1992a) com a vantagem de ser um hormônio específico que atua sobre certas células da hipófise do receptor, induzindo a síntese e liberação de gonadotropina para a maturação gonadal.

A utilização desses análogos na indução à desova do pacu-caranha já foi realizada com sucesso por alguns pesquisadores (Bernardino *et al.*, 1987; Carolsfeld *et al.*, 1988; Zaniboni Filho e Barbosa, 1991), porém a dosagem necessária para o efetivo resultado apresenta uma correlação positiva com a temperatura da água. A região sul do Brasil ainda não possui um adequado protocolo de indução à desova dessa espécie, com o LHRH-a, estando dependente da hipofiseção para a obtenção de alevinos.

Este trabalho objetiva estabelecer a dosagem de LHRH-a necessária para induzir a maturação final e ovulação/espermiação do pacu-caranha, comparando os custos de produção dos embriões desta espécie com a utilização do LHRH-a e da técnica tradicional de hipofiseção.

Material e métodos

Os experimentos foram realizados no Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú (CEPC), localizado junto ao Colégio Agrícola, no município de Camboriú, SC.

Foram selecionados oito casais de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) do plantel de reprodutores do CEPC, de acordo com as características de maturação gonadal descritas por Woynarovich e Horvath (1983).

Uma dosagem prévia de hormônio foi aplicada (0,25 mg de EPC/kg de peixe), 12 horas antes do início dos tratamentos, de acordo com Zaniboni Filho e Barbosa (1991).

Após a injeção da prévia, machos e fêmeas foram etiquetados e mantidos em grupo de quatro, separados por sexo, em tanques acrados de 1000 litros, com renovação de água.

Os exemplares machos e fêmeas foram destinados, aleatoriamente, aos tratamentos com extrato de pituitária de carpa (EPC), e LHRH-a D-

Indução à espermição e desova do Pacu-caranha

ALA6 des-GLY, como apresentado na tabela 1. O EPC foi adquirido de produtores regionais, enquanto o LHRH-a foi importado diretamente do fabricante (Sigma Chemical Co.).

Após a injeção da última dose de cada hormônio foi medida a temperatura da água dos tanques de reprodutores, a cada duas horas.

Os gametas foram obtidos por extrusão e fertilização à seco, de acordo com Woyanovich e Horvath (1983), e mantidos em incubadora tipo funil de 20 ou 60 l, ou em tanques aerados de 1000 l.

Para avaliar a qualidade do esperma, óvulos de duas fêmeas tratadas com EPC e de duas induzidas com LHRH-a foram separados e fertilizados com esperma obtido de machos tratados com cada tipo de hormônio. Esse procedimento permitiu a obtenção de quatro cruzamentos fertilizados com sêmen produzido, através da utilização de EPC, e quatro com o uso de LHRH-a, de modo que parte dos óvulos de uma fêmea foi fertilizado com cada tipo de sêmen. Mantidos em incubadoras separadas, a taxa de fertilização foi utilizada para comparar a qualidade do esperma produzido. A Prova de Mann-Whitney (0,05) foi utilizada para testar a semelhança da qualidade do esperma obtido com cada tipo de hormônio.

Tabela 1 - Diferentes tratamentos hormonais utilizados para indução à ovulação/espermição do pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*).

Tratamento (*)	Tipo de Hormônio (**)	Sexo	Protocolo de Aplicação			
I	EPC	F	0,5mg	(12h)		4,5mg
II	LHRH-a	F	1,0µg	(12h)		10,0µg
III	LHRH-a	F	1,5µg	(12h)		15,0µg
IV	LHRH-a	F	2,0µg	(12h)		20,0µg
V	EPC	M	-	-		2,0mg
VI	LHRH-a	M	-	-		5,0 µg
VII	LHRH-a	M	-	-		7,0µg
VIII	LHRH-a	M	-	-		10,0µg

(*) - Foram utilizados dois exemplares em cada tratamento.

(**) - Todos os tratamentos receberam uma dose prévia contendo 0,25mg EPC/kg de peixe, 12 horas antes da aplicação da primeira injeção.

O volume de espermatozoides liberado por cada macho foi quantificado e expresso como valor médio de cada tratamento.

Os ovos fertilizados foram mantidos em densidades semelhantes às máximas aconselhadas por Zaniboni Filho (1992) para cada incubadora, ou seja, 160 e 2500 ovos/l para tanques aerados e incubadoras tipo funil, respectivamente. Embora a água utilizada para incubação apresentasse elevada turbidez e baixos valores de oxigênio dissolvido ($\pm 4,0$ ppm), foi mantido o fluxo de água de aproximadamente 4 l/min para as incubadoras e 5 l/min para os tanques aerados, de acordo com o sugerido por Zaniboni Filho (1992).

A taxa de fertilização foi estimada imediatamente após a fase de fechamento do blastóporo, utilizando o número amostral de 260 ovos/incubadora, de acordo com Zaniboni Filho e Barbosa (1992b).

Para avaliação dos diferentes protocolos de indução das fêmeas, foi considerado a efetividade do tratamento, a quantidade de óvulos liberados por peso de reprodutor e a taxa de fertilização dos óvulos.

Os custos para aquisição do EPC e do LHRH-a foram de US\$ 350,00 /g e US\$ 23,00/mg, respectivamente.

Resultados

A temperatura média da água dos tanques aerados foi de 27° C, durante os trabalhos de indução hormonal, apresentando uma amplitude de variação igual a 1° C.

A tabela 2 mostra os resultados médios apresentados pelas fêmeas submetidas aos distintos protocolos de indução à desova. Os melhores resultados foram observados pelas fêmeas tratadas com EPC, que apresentaram a maior taxa de fertilização (50,2%) e maior quantidade de óvulos liberados por peso de fêmea (218 g/kg), além das duas fêmeas tratadas terem desovado.

Dentre aquelas injetadas com LHRH-a, as que receberam a maior quantidade de hormônio (20 μ g/kg) sequer liberaram os óvulos, mostrando o ventre endurecido após nove ou dez horas da última injeção. Todos os exemplares tratados com 10 ou 15 μ g de LHRH-a/kg responderam à indução e liberaram óvulos férteis, com maior taxa de fertilização apresentada pelos

Indução à espermição e desova do Pacu-caranha

oriundos do tratamento com $15 \mu\text{g}/\text{kg}$, que também possibilitou a liberação de maior quantidade de óvulos por peso de fêmea.

Tabela 2 - Resultados obtidos nos diferentes protocolos de indução à desova de fêmeas de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*), com EPC e LHRH-a.

Trat.	Núm. de Fêmeas (*)	Peso Médio (kg)	Tempo para Desova (h)	Tempo para Desova (°/h)	Peso de Óvulos (g)(**)	g Óvulos/kg Fêmea (**)	Taxa de Fertil. (%) (n)	Taxa de Fertil. (%) média
I	2/2	1,1	8:50 10:20	238 279	240	218	(4)	50,2
II	2/2	1,2	12:50 17:00	346 59	140	117	(3)	25,0
III	2/2	1,0	10:50 14:00	92 78	200	200	(3)	41,5
IV	0/2	1,2	---	---	---	---	---	---

(*) - Número de fêmeas desovadas/tratadas.

(**) - Valores médios obtidos em uma única extrusão de cada fêmea.

Após a última injeção de hormônio, o tempo para ovulação/desova foi menor nos exemplares tratados com EPC e, dentre os induzidos com LHRH-a, maior nas fêmeas que receberam a dosagem inferior de hormônio ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$).

A indução à espermição parece ser mais facilmente obtida, pois todos os tratamentos foram efetivos. Houve variação na quantidade de sêmen liberado pelos machos submetidos aos diferentes protocolos (Tabela 3). Dentre os tratados com LHRH-a, houve uma correlação direta, com a maior quantidade de hormônio ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$) induzindo a liberação de maior volume de sêmen ($13,1 \text{ ml}/\text{kg}$). Os machos hipofisados também produziram quantidades semelhantes, em média $13,4 \text{ ml}/\text{kg}$.

Tabela 3 - Valores médios da quantidade de esperma produzida pelos machos de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) tratados com EPC e LHRH-a.

Tratamento	Núm. de Machos (*)	Peso Médio (kg)	Volume de Esperma (ml)	Volume de Esperma (ml)/kg de Macho (ml/kg)
V	2/2	0,9	12,1	13,4
VI	2/2	1,4	9,0	6,4
VII	2/2	1,0	10,9	10,9
VIII	2/2	1,1	14,4	13,1

(*) - Número de machos extrusados/tratados.

Na Figura 1, está apresentada a correlação da taxa de fertilização dos ovos de quatro fêmeas, onde parte dos óvulos foi fertilizada com sêmen obtido com o uso de LHRH-a e parte com EPC. De acordo com a Prova de Mann-Whitney, o esperma produzido com LHRH-a é semelhante, qualitativamente, àquele produzido com a utilização de EPC.

Comparando os custos para indução à espermição e desova do pacu-caranha, considerando as dosagens de 5,0 mg EPC/kg ou 16,5 µg LHRH-a/kg para as fêmeas e 2,0 mg EPC/kg ou 7 µg LHRH-a/kg para os machos, pode ser observado que os custos para induzir um quilo de cada sexo são de US\$ 4,90 e US\$ 1,08 utilizando EPC e LHRH-a, respectivamente.

Indução à espermiacão e desova do Pacu-caranha

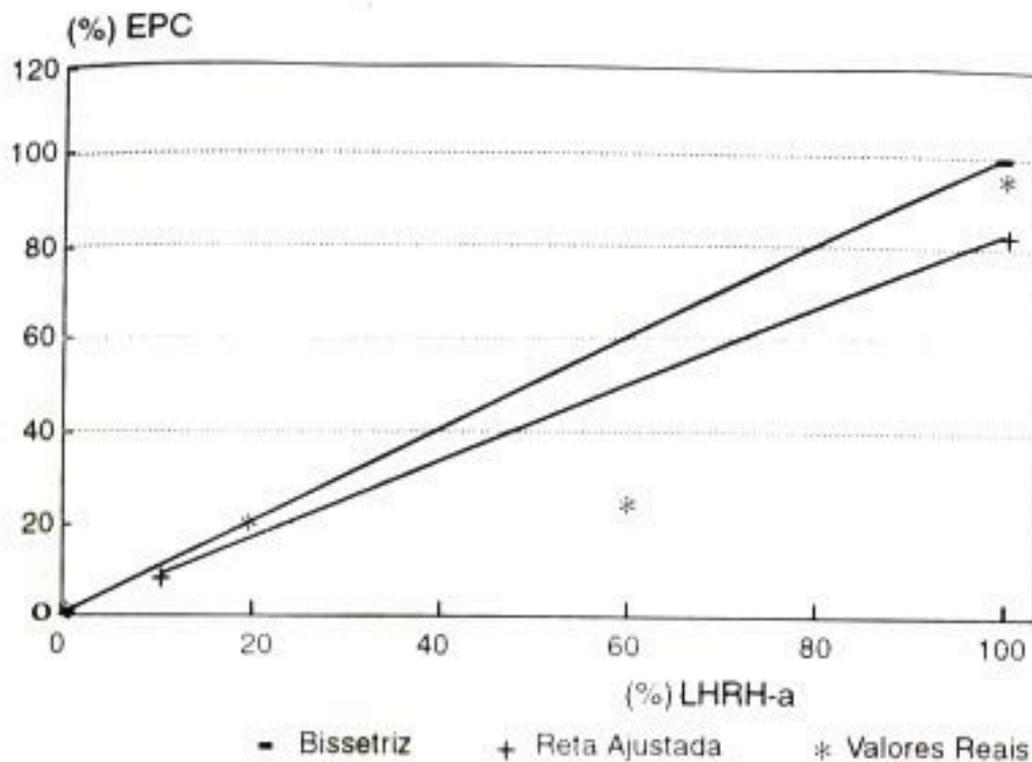


Figura 1 - Relação entre a taxa de fertilização dos ovos fecundados com sêmen obtido de machos induzidos com LHRH-a e com EPC, com óvulos oriundos de cada uma das quatro fêmeas de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*). ($y = 0,814x - 0,16$) ($r = 0,91$).

Discussão

Ferraz de Lima (1989) apresenta uma coletânea de resultados de indução à desova do pacu-caranha, possibilitando analisar comparativamente os valores obtidos neste trabalho. A efetividade do tratamento de indução à ovulação e desova com EPC e LHRH-a tem sido de 75 e 68,7%, respectivamente. Neste trabalho, embora com a utilização de um pequeno número de exemplares, o LHRH-a possibilitou resultados semelhantes, enquanto que o EPC foi mais efetivo.

O tempo para a desova dessa espécie, após a última injeção, tem sido observado entre 12 e 14 horas para a indução com EPC e a temperatura da água variando entre 22 e 24,5 °C (Godinho e Godinho, 1986). Com a utilização do LHRH-a, o tempo para a desova varia entre 13 e 20 horas, para uma temperatura da água entre 24,5 e 26 °C (Carolsfeld *et al.*, 1988).

Neste experimento, com a temperatura média da água mantida em 27 °C, a liberação dos ovócitos ocorreu num período inferior, entre 8,8 e 10,3 horas com o EPC e 10,8 até 17,0 horas para aquelas induzidas com LHRH-a. Cabe salientar que o tempo de desova apresenta uma correlação inversa com a temperatura da água. Por outro lado, analisando o tempo necessário para ovulação nos peixes tratados com 10 e 15 µg de LHRH-a /kg, é verificado que a dose mais elevada promove a resposta em tempo mais curto, sugerindo que o tempo de desova também esteja relacionado com a injeção da dosagem ideal de hormônio.

A quantidade de óvulos liberada pelas fêmeas, de acordo com Ferraz de Lima (1989), varia entre 117 e 234 g/kg de peixe, semelhante aos valores observados neste trabalho.

Embora a taxa de fertilização dos ovos desta espécie, de acordo com Ferraz de Lima (1989), oscile entre 30 e 75%, próximo aos valores obtidos neste experimento, cabe salientar que os ovos foram incubados com água contendo baixos teores de oxigênio dissolvido e elevada turbidez, que certamente contribuíram para a redução da taxa de fertilização.

Semelhante ao observado neste trabalho, Carolsfeld (1989) relata que a totalidade dos machos de pacu-caranha tratados com diferentes protocolos de indução hormonal, responderam positivamente.

Considerando que a utilização do EPC e do LHRH-a possibilita a obtenção de resultados semelhantes na indução à espermição e desova do pacu-caranha, aplicando dosagens para fêmeas de 5,0 mg/kg e 16,5 µg/kg e para machos de 2,0 mg/kg e 7,0 µg/kg, para EPC e LHRH-a, respectivamente, verificamos que o custo é 4,5 vezes menor, quando se utiliza LHRH-a, além das vantagens fisiológicas descritas por Donaldson e Hunter (1983).

Referências bibliográficas

Bernardino, G.; Alcântara, R.C.G. de e Ormanezi, R. (1987). Efeitos do LHRH-a na maturação dos ovários de pacu,

- Carolsfeld, J.; Ramos, S.M.; Ormanezi, R.; Gomes, J.H.; Barbosa, J.M. and Harvey, B. (1988). Analysis of protocols for application of an LHRH analog for induced final maturation and ovulation of female pacu (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887). *Aquaculture*, 74:49-55.
- Donaldson, E.M. and Hunter, G.A. (1983). Induced final maturation, ovulation, and spermiation. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J. and Donaldson, E.M. (Eds.). *Fish Physiology*, Vol. IX-b. Academic Press. New York, pp.351-403.
- Ferraz de Lima, J.A. (1989). Reprodução, larvicultura e genética. In: Hernandez R., A. (Editor). *Cultivo de Colossoma*. SUDEPE/ COLCIENCIAS/CIID, Bogotá, Colômbia, pp.315-332.
- Godinho, H.P. and Godinho, A.L. (1986). Induced spawning of the pacu, *Colossoma mitrei* (BERG, 1895), by hypophysation with crude carp pituitary extract. *Aquaculture*, 55:69-73.
- Sato, Y. (1989). Reprodução induzida do dourado (*Salminus brasiliensis*) da bacia do rio São Francisco (nota preliminar). *Res. VII Enc. Anual de Aquicultura de Minas Gerais*. Belo Horizonte-MG, Brasil, pp.11.
- Woynarovich, E. e Horvath, L. (1983). *A propagação artificial de peixes de águas tropicais - Manual de extensão*. FAO/CODEVASE/CNPq, Brasília-DF, 220pp.
- Zaniboni Filho, E. (1992). *Incubação, larvicultura e alevinagem do tambaqui (Colossoma macropomum CUVIER, 1818)*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, Brasil, 202pp.
- Zaniboni Filho, E. e Barbosa, N.D.C. (1991). Importância de uma aplicação prévia de hormônio na indução à desova de peixes reofílicos. *Res. IX Enc. Anual de Aquicultura de Minas Gerais*. Belo Horizonte-MG, Brasil, pp.36.
- Zaniboni Filho, E. e Barbosa, N.D.C. (1992a). Eficiência do LHRH-a na indução à desova de algumas espécies reofílicas. *Res. 1ª Reunião Anual do Instituto de Pesca*. São Paulo-SP, Brasil, pp.66.
- Zaniboni Filho, E. e Barbosa, N.D.C. (1992b). Número amostral para determinação da taxa de fertilização durante a incubação dos ovos de peixes reofílicos. *Res. 1ª reunião anual do Instituto de Pesca*. São Paulo-SP, Brasil. pp.65.