

ARTIGO | ARTICLE

# Indução da maturação gonadal do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792), em cativeiro: aplicação de diferentes protocolos de indução da maturação e indutores hormonais

*Inducing gonadal maturation in the common snook, Centropomus undecimalis, in captivity: application of different protocols of gonadal maturation induction and hormonal inducers*

Eduardo de Medeiros Ferraz<sup>1</sup>  
Vinicius Ronzani Cerqueira<sup>2</sup>

## RESUMO

Com o objetivo de possibilitar a maturação gonadal do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, em cativeiro, foram desenvolvidos experimentos nos períodos 2007/2008 e 2008/2009, em Florianópolis, estado de Santa Catarina. No primeiro período, 54 reprodutores foram induzidos à maturação, por meio de implantes de Silastic® MDX4-4210, contendo  $4\text{mg.kg}^{-1}$   $17\alpha$ -metiltestosterona ( $17\alpha$ -MT) ou  $4\text{mg.kg}^{-1}$  ( $17\alpha$ -MT) +  $50\mu\text{g.kg}^{-1}$  do análogo do hormônio liberador do hormônio luteinizante ou sem hormônio (controle). No período seguinte, 36 machos receberam tratamento crônico, alternando hormônio foliculo estimulante e gonadotrofina coriônica humana, em cinco doses (uma por semana), enquanto duas fêmeas receberam tratamento crônico com gonadotrofina coriônica humana, em seis doses (uma por semana). Em março de 2008, o número de animais espermiando foi significativamente maior que em fevereiro ( $p < 0,05$ ), mas não se verificou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. Os hormônios provocaram aumento do volume de sêmen, sendo maior nos machos tratados com  $17\alpha$ -MT + análogo do hormônio liberador do hormônio luteinizante. Em abril de 2008, a produção de sêmen decresceu em todos os animais, exceto no

<sup>1</sup> Instituto de Pesca, Centro de Aquicultura. Av. Francisco Matarazzo, 455, 05001-900, São Paulo, SP, Brasil. Correspondência para/ Correspondence to: E.M. FERRAZ. E-mail: <emferraz@pesca.sp.gov.br>.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura. Florianópolis, SC, Brasil.

grupo controle. Os dados permitem concluir que os implantes de  $17\alpha$ -MT e  $17\alpha$ -MT + análogo do hormônio liberador do hormônio luteinizante antecipam o processo de espermiacção. Em março de 2009, o pequeno número de animais espermiando e o baixo volume de sêmen indicaram pequena eficiência dos tratamentos crônicos; por outro lado, nas fêmeas, possibilitou o início da vitelogenese, comprovada pela presença de ovócitos vitelogênicos ( $150\mu\text{m}$ ) após a terceira aplicação de gonadotrofina coriônica humana. As melhorias obtidas sugerem a necessidade de se reavaliarem os atuais protocolos e se implementarem outros procedimentos para o efetivo desenvolvimento gonadal do robalo-flecha em laboratório.

**Palavras-chave:** Análogo do hormônio liberador do hormônio luteinizante. Hormônio folículo estimulante. Gonadotrofina coriônica humana.

## ABSTRACT

*With the aim of facilitating gonadal maturation in the common snook, Centropomus undecimalis, in captivity, experiments in the 2007/2008 and 2008/2009 reproductive seasons were performed in Florianópolis, in the state of Santa Catarina. In the first period, 54 brooders were induced to maturation by means of Silastic®MDX4-4210 implants containing  $4\text{mg.kg}^{-1}$   $17\alpha$ -methyltestosterone ( $17\alpha$ -MT) or  $4\text{mg.kg}^{-1}$  ( $17\alpha$ -MT) +  $50\mu\text{g.kg}^{-1}$  luteinizing hormone-releasing hormone analogue or without hormone (control group). In the following reproductive season, 36 males received chronic treatment, alternating between follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotropin (hCG), applying five doses (once a week) while two females received chronic treatment with six doses of hCG (once a week). In March 2008, the number of animals spermatizing was significantly higher than in February ( $p < 0.05$ ), however there was no significant difference ( $p > 0.05$ ) between the treatments. The hormones caused an increase in milt volume, it being higher in males treated with  $17\alpha$ -MT + luteinizing hormone-releasing hormone analogue. In April 2008, the production of milt decreased in all animals except in the control group. The data suggest that the implanting of  $17\alpha$ -MT and  $17\alpha$ -MT + luteinizing hormone-releasing hormone analogue accelerates the spermiation process. In March 2009, the small number of animals spermatizing and the low milt volume indicates low efficiency of chronic treatment; on the other hand, in females, it permitted the start of vitellogenesis, as witnessed by the presence of vitellogenic oocytes ( $150\mu\text{m}$ ) after the third application of hCG. The improvements suggest the need to reevaluate the present protocols and to implement other procedures for the effective gonadal development of common snook in the laboratory.*

**Key words:** Luteinizing hormone-releasing hormone analogue, Follicle stimulating hormone. Human chorionic gonadotropin.

## INTRODUÇÃO

O processo de confinamento de reprodutores de peixes ocasiona falhas no processo de maturação e desova de várias espécies cultivadas. Zohar & Mylonas (2001) classificam esses problemas reprodutivos em três categorias: (1) não ocorrência da vitelogenese e espermatogenese; (2) vitelo-

gênese e espermatogênese normais, mas sem maturação final dos ovócitos e com produção de pequeno volume de sêmen; e (3) não ocorrência de desova no final do ciclo reprodutivo. Desse modo, os fatores que limitam o sucesso reprodutivo de peixes em cativeiro estão diretamente relacionados à qualidade dos gametas masculino e feminino produzidos.

Na década de 1980, verificam-se os primeiros trabalhos com sistemas de liberação prolongada do análogo do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRHa - *Luteinizing Hormone-Releasing Hormone analogue*) para peixes (Crim *et al.*, 1983). Esses sistemas proporcionam a liberação gradual do hormônio na corrente sanguínea do receptor, diminuindo o efeito sobre sua degradação; com isso, níveis elevados de gonadotrofina são obtidos na circulação do animal (Mylonas & Zohar, 2001). Sistemas de liberação prolongada são utilizados também na aplicação de esteróides sexuais, como a Testosterona (T), associados ou não ao uso de hormônio liberador de gonadotrofina (*Gonadotropin-Releasing Hormone* - GnRH), tanto para acelerar a maturação, quanto para aumentar a produção de sêmen nos machos (Henry *et al.*, 1998; Zanuy *et al.*, 1999; Hassin *et al.*, 2000; Holland *et al.*, 2002; Aizen *et al.*, 2005).

Zohar & Mylonas (2001) consideram que, nos casos em que vitelogenese e espermatogenese não ocorrem em peixes em cativeiro, e quando os hormônios como o GnRH e seus análogos não são totalmente eficazes, uma alternativa seria a aplicação de gonadotrofinas exógenas, como o hormônio gonadotrófico coriônico humano (hCG). No entanto, o sucesso do tratamento hormonal pode depender da duração do processo de maturação da espécie, bem como do real estágio em que se encontra a gônada, no início dos protocolos de indução (Mylonas *et al.*, 2010). Ohta *et al.* (1997) comentam o sucesso obtido na maturação em cativeiro da enguia japonesa, *Anguila japonica*, após aplicação de terapias crônicas com hormônio gonadotrófico purificado de salmão em fêmeas, e do hormônio gonadotrófico coriônico humano (Hcg - *Human chorionic gonadotropin*) em machos. Esse tipo de terapia crônica também foi efetiva na obtenção de vitelogenese e espermatogenese em enguia europeia, *Anguila anguila* (Pedersen, 2003).

No Brasil, problemas relacionados à maturação do robalo-flecha em cativeiro são relatados por Soligo *et al.* (2008), que verificaram reduzida produção de sêmen mesmo nos reprodutores submetidos à injeção de LHRHa. Pequeno volume

de sêmen e ausência de vitelogenese também foi verificado por Ferraz & Cerqueira (2010) em reprodutores de robalo-flecha, submetidos a confinamento em diferentes regimes de temperatura. Cerqueira (2009) considera essa dificuldade de maturação de animais em cativeiro como o principal entrave para produção comercial da espécie. Assim, a geração de tecnologia que garanta a produção regular de robalo-flecha em cativeiro, pode proporcionar emprego e aumento de renda aos pescadores e piscicultores, sendo de fundamental importância para políticas de fomento e de desenvolvimento da atividade. Dessa maneira, o objetivo do presente estudo foi desenvolver diferentes protocolos de aplicação hormonal, de maneira a contribuir para a maturação gonadal do robalo-flecha em condições de laboratório.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Os peixes e o sistema de confinamento

Em 1999, exemplares juvenis de robalo-flecha capturados no litoral da Bahia (município de Santo Amaro) e transportados para as instalações do laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) da Universidade Federal de Santa Catarina, no município de Florianópolis (SC), foram mantidos em tanques-rede instalados em viveiro com água salobra sob influência de maré e alimentados com ração comercial para peixes carnívoros (40%-50% de proteína).

Em 2003, os animais foram transferidos para tanques de concreto de 8 mil litros, com água marinha (35‰), filtro biológico interno, renovação de água (5%/h) e aeração constante, tanques esses localizados no interior de salas destinadas à manutenção de reprodutores, as quais, em 2006, foram adaptadas para operar com sistema de fotoperíodo natural simulado (FNS), baseando-se nos dados da região (Latitude: 27°36'S, Longitude: 48°37'W, fonte EPAGRI). A intensidade luminosa de 1.000 Lux na superfície da água foi obtida utilizando-se 4 lâmpadas fluorescentes de 32W.

O alimento consistiu de 50% de um produto comercial seco (*fish breed-M INVE*® Alimentos) e

50% de parte úmida (30% sardinha moída e 20% de lula moída), com valor de proteína bruta ao redor de 60%. A taxa de alimentação foi de 1% do peso vivo por dia, fornecida de três a cinco vezes por semana, de acordo com a temperatura.

Os parâmetros de qualidade da água dos tanques de reprodutores foram registrados da seguinte maneira: diariamente, temperatura (°C) (termômetro digital *full gauge*) e salinidade (‰) (refratômetro portátil); duas vezes por semana, amônia total (mg/L) (fotocolorímetro digital Alfakit) e pH (fita indicadora universal de pH, Merck).

## Desenho experimental

Foram realizados experimentos em dois períodos reprodutivos: 2007/2008 e 2008/2009. No primeiro, foram utilizados 54 reprodutores com peso médio =  $2.818 \pm 566$ g e comprimento médio =  $671 \pm 41$ mm, identificados através de *microchip* eletrônico (AVID). Estavam distribuídos em seis tanques de 8 mil litros ( $3.170\text{g/m}^3$ ), com renovação de água marinha (1L/10s) e aeração constante.

Peletes foram moldados com elastômero (Silastic® MDX4-4210 *Biomedical Grade Elastomer Dow Corning*), com auxílio de *paillets* de inseminação artificial de 0,5mL. Os hormônios LHRHa e  $17\alpha$ -metiltestosterona foram misturados separadamente ao elastômero e, ainda na forma líquida, aspirados para as *paillets*. Hastes cilíndricas dos hormônios foram moldadas e seccionadas em função do peso de cada reprodutor. Algumas hastes foram moldadas com elastômero sem hormônio.

Os reprodutores foram submetidos a três tratamentos hormonais: 1) implante com  $17\alpha$ -metiltestosterona ( $4\text{mg.kg}^{-1}$ ) + implante sem hormônio; 2) implante com  $17\alpha$ -metiltestosterona ( $4\text{mg.kg}^{-1}$ ) + implante com LHRHa ( $50\mu\text{g.kg}^{-1}$ ); e 3) implante sem hormônio (controle). A dose de  $17\alpha$ -metiltestosterona utilizada foi baseada nos dados do trabalho de Hassin *et al.* (2000) e do LHRHa no de Ferraz *et al.* (2002).

Os implantes de elastômero foram feitos no início de fevereiro de 2008. Para tanto, os animais foram sedados com benzocaína ( $60\text{mg.L}^{-1}$ ) e

submetidos a uma incisão com bisturi na região abdominal, próximo à nadadeira peitoral. Os peletes foram introduzidos na cavidade abdominal com auxílio de pinça de ponta fina e curva. Para definição das dosagens de hormônio utilizou-se o peso dos animais registrado no mês de dezembro de 2007, sendo a haste cilíndrica de cada hormônio seccionada e pesada, de acordo com a quantidade de hormônio necessária.

No segundo período, 36 machos com peso médio =  $2.975 \pm 408$ g e comprimento médio =  $685 \pm 31$ mm foram distribuídos em seis tanques de 8.000L de capacidade (seis peixes por tanque =  $2.231\text{g/m}^3$ ). Estes foram submetidos a três tratamentos hormonais, iniciados em 15/02/09: 1) doses semanais de hCG ( $250\text{IU.kg}^{-1}$ ) por quatro semanas e uma dose definitiva de hCG ( $500\text{IU.kg}^{-1}$ ) na quinta semana (denominado tratamento hCG); 2) na primeira semana, dose de  $1,5\text{mg.kg}^{-1}$ , na segunda semana, de  $2,5\text{mg.kg}^{-1}$  de FSH (Folltropin-V Bioniche - Canadá) e, nas três semanas seguintes, doses de hCG ( $250$ ;  $250$  e  $500\text{IU.kg}^{-1}$ ) (denominado tratamento FSH + hCG); 3) para o denominado tratamento controle, os animais receberam apenas solução salina em todas as semanas, conforme os tratamentos anteriores.

Com duas fêmeas identificadas, uma no período 2006/2007 e outra no período 2007/2008, foi realizado um ensaio para verificar o efeito de tratamento crônico com hCG sobre o desenvolvimento dos ovários. Assim, as fêmeas foram submetidas a doses semanais de hCG ( $250\text{IU.kg}^{-1}$ ) por cinco semanas consecutivas, e uma dose definitiva de  $500\text{IU.kg}^{-1}$  na sexta semana.

Para administração do hormônio, os animais foram anestesiados com benzocaína ( $60\text{mg.L}^{-1}$ ), sendo o hormônio injetado na musculatura da região dorsal, acima da linha lateral. Para definição das dosagens utilizou-se o peso registrado no mês de fevereiro.

## Análise do desenvolvimento gonadal dos reprodutores

Os indivíduos foram anestesiados com benzocaína ( $60\text{mg.L}^{-1}$ ) e registrados dados de comprimento total (C) em centímetro, e de peso (P)

em grama (0,01g). O fator de condição (K) foi calculado como  $(P(g)/C(cm)^3) \times 100$ .

Em seguida, para análise do desenvolvimento gonadal dos machos, verificou-se a liberação ou não de sêmen; nas fêmeas, verificou-se a medida de ovócitos coletados por biópsia ovariana.

Para verificar a liberação ou não de sêmen na região da papila genital, os animais anestesiados foram massageados na região ventral, no sentido céfalo-caudal. Seringa hipodérmica de 1mL foi utilizada para coleta e medição do volume espermático. Volumes menores de sêmen foram aferidos com seringa com precisão de  $\mu\text{L}$  (Hamilton 10 $\mu\text{L}$ ).

Dos reprodutores que não apresentaram sêmen, foram retiradas amostras das gônadas com auxílio de catéter plástico (0,8mm de diâmetro interno), introduzido no gonoduto (Ferraz *et al.*, 2004). O material coletado foi examinado sob estereomicroscópio (Wild M7), acoplado com ocular micrométrica, sendo medidos aproximadamente 50 ovócitos para definição do diâmetro médio.

### Análise dos dados

Os resultados dos diferentes tratamentos hormonais foram examinados para o período reprodutivo compreendido entre outubro de 2007 e abril de 2008. Os parâmetros de comprimento médio (mm), peso médio (g) e fator de condição foram comparados pela análise de medidas repetidas (ANOVA). Diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de significância de  $\alpha=0,05$ . As médias são apresentadas e o desvio padrão. A porcentagem de machos espermiando observados no plantel foi transformada para valores de arco-seno, para posterior aplicação de análise de medidas repetidas (ANOVA). Diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de significância de  $\alpha=0,05$ . Os volumes de sêmen foram avaliados pela análise não paramétrica de Kruskal-Wallis. O aplicativo Statística® 7.0 foi utilizado para as análises. Para o período de fevereiro de 2009 a março de 2009, os parâmetros de comprimento médio (mm), peso médio (g) e fator de condição foram tabulados.

## RESULTADOS

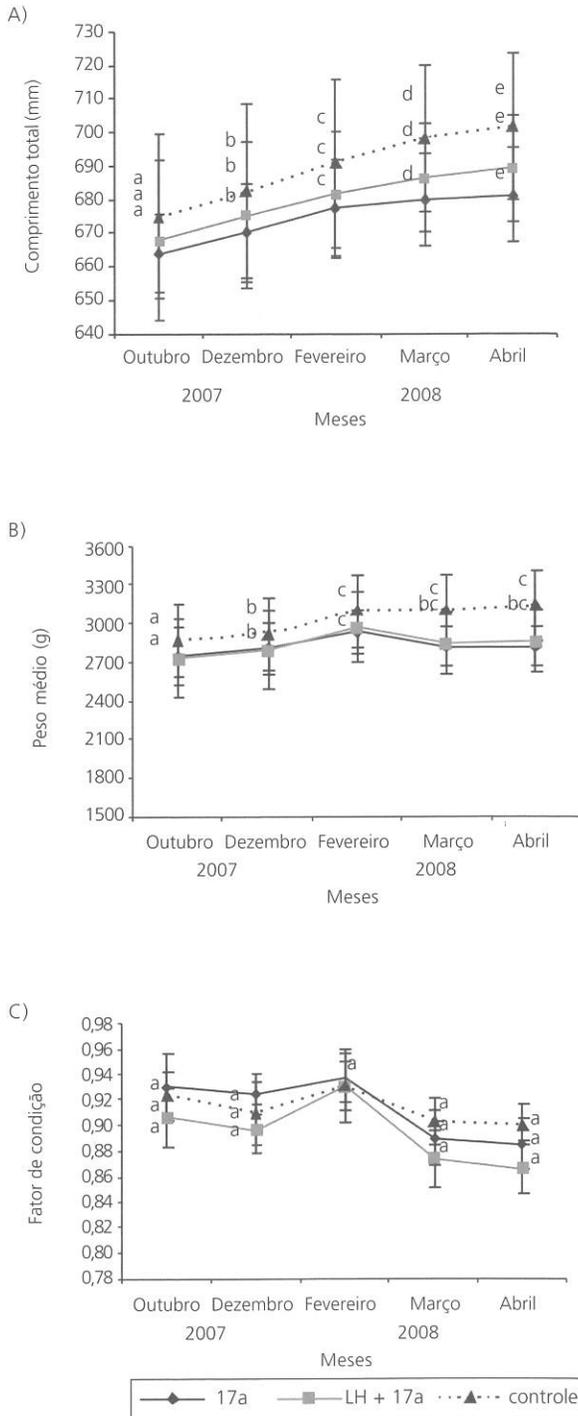
Os valores dos parâmetros de qualidade da água observados no período de outubro de 2007 a abril de 2008 foram: temperatura 20,5-27,7°C; salinidade 35-36‰; oxigênio dissolvido 4,7-7,2mg L<sup>-1</sup>; amônia total 0-0,23mg L<sup>-1</sup>; pH 8,0.

Os dados de desempenho dos animais em comprimento, peso e fator de condição são apresentados na Figura 1. Analisando-se esses dados, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). No entanto, em relação aos meses, foram verificadas diferenças significativas ( $p<0,05$ ) para comprimento e peso, mas não em relação ao fator de condição.

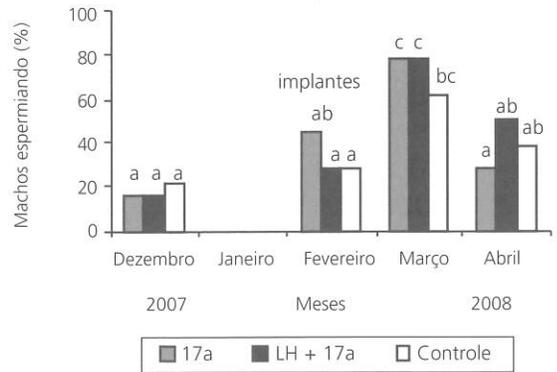
A sobrevivência dos reprodutores no período foi de 98%, com morte de apenas uma matriz, a qual não foi ocasionada pelo emprego dos tratamentos hormonais, mas por um evento relacionado ao retorno do animal após a anestesia.

O maior número de machos espermiando foi registrado no mês de março (Figura 2), após aplicação hormonal, não se observando diferença significativa em relação aos tratamentos ( $p>0,05$ ). No entanto, diferenças significativas ( $p<0,05$ ) foram observadas entre os meses.

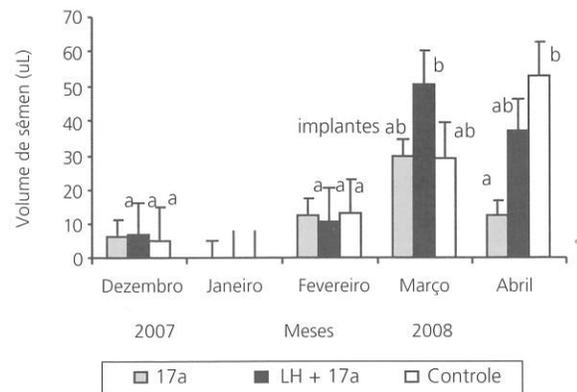
Quanto ao volume de sêmen ao longo do período reprodutivo, constatou-se aumento, com picos em março e abril de 2008 (Figura 3). Os valores médios do volume de sêmen dos exemplares dos seguintes tratamentos foram: A) tratamento (17 $\alpha$  MT) 12,5  $\pm$  7,7 $\mu\text{L}$  (10 - 30 $\mu\text{L}$ ), 29,2  $\pm$  34,3 $\mu\text{L}$  (10 - 100 $\mu\text{L}$ ) e 12,0  $\pm$  4,5 $\mu\text{L}$  (10 - 20 $\mu\text{L}$ ), B) tratamento (17 $\alpha$  MT + LHRH) 11,0  $\pm$  5,5 $\mu\text{L}$  (5- 20 $\mu\text{L}$ ), 50,8  $\pm$  35,7 $\mu\text{L}$  (10 - 100 $\mu\text{L}$ ) e 37,0  $\pm$  45,0 (10 a 140 $\mu\text{L}$ ) e C) tratamento (controle) 13,0  $\pm$  9,7 $\mu\text{L}$  (5 - 30 $\mu\text{L}$ ), 29,1  $\pm$  30,5 $\mu\text{L}$  (10 - 100 $\mu\text{L}$ ) e 52,8  $\pm$  35,9 (10 a 100 $\mu\text{L}$ ), respectivamente nos meses de fevereiro, março e abril. Apesar das diferenças verificadas nos volumes de sêmen em março e abril, sendo maior valor no tratamento (17 $\alpha$  MT + LHRH), e em abril, no tratamento (controle), não foi possível verificar diferença significativa entre os dois tratamentos ( $p>0,05$ ), através de análise não paramétrica de Kruskal-Wallis. No entanto, no mês de abril, o resultado do tratamento controle foi significa-



**Figura 1.** Média e desvio-padrão do comprimento total (mm) (A), peso (g) (B) e fator de condição (C) de robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, no período reprodutivo (outubro - abril) de 2007/2008, antes e após tratamentos hormonais. Nota: Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os meses.



**Figura 2.** Porcentagem de machos espermiando de robalo-flecha, *C. undecimalis*, no período reprodutivo de 2007/2008. Nota: Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os meses.



**Figura 3.** Média e desvio-padrão do volume de sêmen obtido em robalo-flecha, *C. undecimalis*, no período reprodutivo de 2007/2008. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

tivamente maior ( $p < 0,05$ ) que o do tratamento (17 $\alpha$  MT).

Os valores dos parâmetros de qualidade da água registrados entre fevereiro e março de 2009 foram: temperatura 25,0-25,9°C; salinidade 35-36‰; oxigênio dissolvido 5,2-6,7mg L<sup>-1</sup>; amônia total 0-0,25mg L<sup>-1</sup>; pH 8,0.

No caso dos machos do robalo-flecha utilizados no período reprodutivo 2008/2009, em março, após o exaustivo procedimento de indução hormonal, apenas 5 animais dos 36 utilizados produziram aproximadamente 10 $\mu$ L de sêmen. Os

protocolos de indução hormonal utilizados não foram adequados para melhoria da maturação, em razão da baixa produção espermática e do reduzido número de reprodutores espermiando, visto que a maior parte do lote não apresentou nenhum sinal de sêmen.

A Tabela 1 apresenta as médias de peso e comprimento dos machos utilizados no período de fevereiro a março de 2009, nos diferentes tratamentos hormonais. Apesar do grande manejo a que os animais foram submetidos, ocorreu incremento de comprimento e peso, mas o fator de condição dos animais diminuiu nos três grupos.

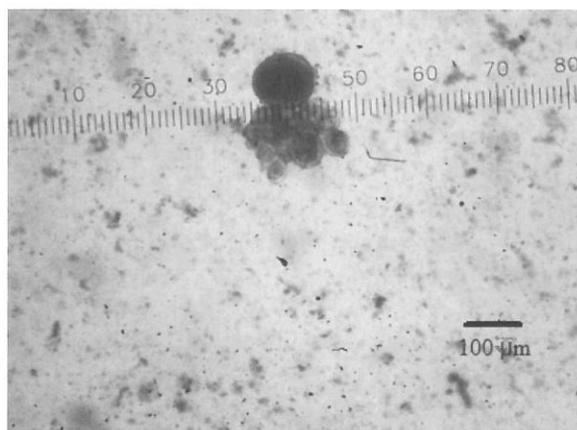
Além da fêmea identificada no período 2006/2007, mais uma fêmea foi encontrada entre os 54 animais estocados no período 2007/2008. No entanto, o material coletado nesses dois exemplares não indicou a evolução dos ovócitos para um estágio mais avançado de desenvolvimento. O diâmetro médio dos ovócitos amostrados foi de  $60\mu\text{m}$  aproximadamente, similar ao observado no período reprodutivo anterior, e o aspecto translúcido do material indicou não estar ocorrendo acúmulo de vitelo, característico de ovócito em desenvolvimento.

As duas fêmeas identificadas nos períodos anteriores foram induzidas à reprodução por seis semanas consecutivas com hCG e tiveram amostras de ovócitos coletadas após cada indução. Na amostra coletada antes da quarta indução de uma das fêmeas, foram observados ovócitos com diâmetro aproximado de  $150\mu\text{m}$  (Figura 4), indicando vitelogênese. A outra fêmea apresentou apenas ovócitos com diâmetro ao redor de  $60\mu\text{m}$ .

## DISCUSSÃO

Nos dois experimentos é evidente a grande dificuldade de se conseguir a maturação de robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, mantido em laboratório. No entanto, os dados obtidos complementam positivamente aqueles registrados no período reprodutivo de 2006/2007 (Ferraz & Cerqueira, 2010), em que foram estabelecidos critérios para controle da temperatura da água de manutenção dos reprodutores e definidas condições adequadas de simulação do fotoperíodo natural (utilizadas no presente experimento).

Os índices zootécnicos de peso e comprimento observados para os reprodutores no período reprodutivo de 2007/2008 foram superiores aos verificados para a espécie, em Cuba, por Reyes



**Figura 4.** Amostra de ovócitos coletada em uma fêmea de robalo-flecha, *C. undecimalis*, em março de 2009, submetida a tratamento com hCG.

Nota: Barra=100 micrômetros

**Tabela 1.** Valores dos parâmetros de crescimento dos reprodutores durante o segundo experimento. Fevereiro a março de 2009.

Parâmetro	HCG		FSH + HCG		Controle	
	M	DP	M	DP	M	DP
Peso inicial (g)	2.934,00	156,00	3.104,00	133,00	2.902,00	277,00
Peso final (g)	2.949,00	163,00	3.132,00	108,00	2.932,00	275,00
Comprimento inicial (mm)	680,00	17,00	698,00	20,00	678,00	25,00
Comprimento final (mm)	689,00	17,00	701,00	14,00	686,00	27,00
Fator de condição inicial	0,93	0,05	0,90	0,05	0,93	0,05
Fator de condição final	0,90	0,04	0,90	0,02	0,91	0,03

M: média; DP: desvio-padrão.

et al. (2004) e Fraga et al. (2006), que utilizaram rações úmidas com cerca de 40% de proteína e frequência alimentar similar à utilizada no presente estudo. Já os valores do fator de condição foram menores que os observados para o robalo-flecha por Fraga et al. (2006) que, no entanto, levaram em consideração, para o cálculo, o comprimento furcal e não o comprimento total dos animais. Contudo, estão muito próximos dos observados para a espécie no período reprodutivo de 2006/2007 (Ferraz & Cerqueira, 2010). Essa condição nutricional do plantel de reprodutores é vista como condição importante para a maturação da espécie. Mylonas et al. (2010) consideram que o comportamento reprodutivo natural, acompanhado por desova espontânea, pode ser perdido em condições de aquicultura. Isso, segundo os autores, pode estar relacionado ao tamanho inadequado dos tanques de manutenção, falta de substratos para a preparação do acasalamento e, possivelmente, outros motivos como a própria questão nutricional.

Esperava-se que os implantes com o elastômero MDX4 com o hormônio  $17\alpha$ -metiltestosterona, isolado ou combinado com LHRHa, pudessem acelerar ou até mesmo potencializar a maturação dos reprodutores machos de robalo-flecha. Zanuy et al. (1999) verificaram que machos de sea bass, *Dicentrarchus labrax*, 15 dias após implantação de elastômero com testosterona (T), apresentavam aumento dos níveis plasmáticos de gonadotrofina (GtH) de aproximadamente 10 vezes em relação aos animais do grupo controle. Hernandez-Rauda & Aldegunde (2002) observaram, para machos juvenis de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, níveis elevados de testosterona no plasma, 20 dias após o início do tratamento com elastômero MDX4 com  $17\alpha$ -metiltestosterona.

Roberts et al. (1999) verificaram que machos de robalo-flecha que ainda não tinham iniciado a espermatogênese ou estavam em regressão apresentavam os menores níveis de testosterona e 11 ketotestosterona (11 KT) no plasma sanguíneo. Segundo os autores, os maiores níveis dos dois andrógenos foram aumentando à medida em que os peixes iniciavam o processo de espermatogênese (início da maturação), e os maiores níveis de T e 11

KT foram verificados em peixes com avançada formação de ductos eferentes nos testículos (maturação intermediária até a final). Dessa forma, os tratamentos empregados deveriam agir de maneira a promover e favorecer níveis elevados de T e 11 KT. Henry et al. (1998) verificaram, para salmão, *Salmo salar*, masculinizado, que somente animais tratados com sistemas de liberação prolongada de testosterona + LHRHa tiveram a maturação acelerada.

Holland et al. (2002) verificaram, para o striped bass, *Morone saxatilis*, que tratamentos com sistemas de liberação prolongada, variando combinações de testosterona, hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e pimozida, não aceleraram o início da maturação para machos, muito embora tenham estimulado a espermatogênese em juvenis. McGuren et al. (2005) relatam o emprego de sistema de liberação prolongada com LHRHa +  $17\alpha$ -metiltestosterona em macho do robalo-asiático, *Lates calcarifer*, com sucesso na liberação de sêmen em trabalhos de indução de desova. Implantes com  $17\alpha$ -metiltestosterona foram eficientes também na indução e melhoria da espermiacão em machos de tainha, *Mugil cephalus* (Aizen et al., 2005). Por outro lado, no caso do linguado senegales, *Solea senegalensis*, apenas a utilização de LHRHa, através de injeção ou implante, não foi suficiente para estimular maturação de machos mantidos em cativeiro (Agulleiro et al., 2006).

Observou-se, em março de 2008, número de animais espermiando significativamente maior que o observado em fevereiro ( $p < 0,05$ ). Contudo, entre os tratamentos não foi verificada diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Após os implantes todos os animais apresentaram volume de sêmen aumentado, e os machos tratados com ( $17\alpha$ -MT + LHRH) produziram maior quantidade de sêmen que os animais dos outros tratamentos. Em abril de 2008, todos os animais, exceto o controle, mostraram decréscimo na produção de sêmen. Analisando-se esses resultados, é possível sugerir que os implantes ( $17\alpha$ -MT e  $17\alpha$ -MT + LHRH) anteciparam o processo de espermiacão. Grier & Taylor (1998) verificaram, durante o desenvolvimento dos testículos do robalo-flecha capturado no litoral da Flórida, valores de

peso e comprimento dos testículos bastante variáveis em dois anos consecutivos de coleta, com picos registrados entre os meses de junho e agosto. Trippel (2003) relata variações na produção de sêmen do bacalhau, *Gadus morhua*, com os maiores valores verificados no mês de março. Mylonas *et al.* (2003) relatam variações na produção de sêmen em *red porgy*, *Pagrus pagrus*, sendo os maiores valores observados de fevereiro a abril, com pico no mês de março. Soligo *et al.* (2008) verificaram que machos de robalo-flecha mantidos em laboratório apresentaram volume muito reduzido de sêmen no mês de janeiro.

Neste trabalho, a produção de sêmen dos reprodutores de robalo-flecha no período de 2007/2008 variou bastante a cada coleta, e os volumes de sêmen obtidos individualmente variaram de 0,01mL a 0,2mL, principalmente no mês de março, no qual foram observados os maiores valores individuais. Esses valores são bastante similares aos encontrados no período reprodutivo anterior, em que o maior valor individual foi de 0,4mL (Ferraz & Cerqueira, 2010). Trippel (2003) relata que em bacalhau *Gadus morhua*, capturado no ambiente natural, a produção de sêmen pode variar de 54mL a 125mL e que no linguado, *Scophthalmus maximus*, em condição de cultivo esta variação pode ser de 0,2mL a 2,2mL por coleta. Rainis *et al.* (2003) relatam grande variação do volume de sêmen coletado (0,05mL até 8,67mL) em diferentes matrizes do robalo europeu, *Dicentrarchus labrax*. Na maioria das vezes, essas variações são decorrentes de características de cada espécie, mas é evidente que a condição de cativeiro pode influir sobremaneira nos volumes obtidos em cada espécie, em função da quebra de gatilhos ambientais específicos (Bromage *et al.*, 2001). De qualquer modo, considera-se que os valores observados em robalo-flecha no presente trabalho são baixos, não estando, provavelmente, de acordo com o esperado para animais em plena maturação. Tiba *et al.* (2009) relatam volumes de sêmen de 0,8mL a 2,4mL, por coleta, no robalo-peva, *Centropomus parallelus*. Valores como esses poderiam ser esperados para o robalo-flecha nas condições examinadas. Problemas

relacionados ao pequeno volume de sêmen produzido ocorrem também no linguado senegalês, *Solea senegalensis*, que, em condições de cativeiro, produz entre 0,005mL e 0,02mL, e, quando capturado no ambiente natural, apresenta produção maior, entre 0,01mL e 0,08mL (Cabrita *et al.*, 2006).

No caso das fêmeas avaliadas no período reprodutivo de 2007/2008, os ovócitos coletados tinham diâmetro médio ao redor de 60µm, similar ao observado no período reprodutivo anterior para espécie (Ferraz & Cerqueira, 2010). Também para robalo-flecha, Grier (2000) considera que esse valor corresponderia ao de um ovócito em crescimento primário. Do ponto vista hormonal, Yaron & Levavi-Sivan (2006) resumizam que o GnRH produzido no hipotálamo estimula a produção do hormônio folículo estimulante (FSH), que promove a secreção de estradiol 17β no folículo ovariano, o qual induz a produção de vitelogenina e coriongenina pelo fígado. Dessa forma, pode-se imaginar que essa sequência não está ocorrendo de maneira efetiva nas fêmeas do robalo-flecha nas condições examinadas. Apesar da identificação de mais uma fêmea no plantel no período reprodutivo de 2007/2008, foi evidente a limitação do processo de vitelogênese, verificado através do reduzido tamanho e do aspecto translúcido do material coletado. Para o robalo-flecha, Neiding *et al.* (2000) relatam que o tamanho de ovócitos com vitelogênese completa é de aproximadamente 450µm e que os reprodutores respondem positivamente ao tratamento hormonal para maturação final e ovulação.

No segundo experimento, realizado no período reprodutivo de 2008/2009, em nova tentativa para maturação do robalo-flecha em cativeiro, o resultado observado nas fêmeas, após três aplicações de hCG, foi bastante promissor, visto que pela primeira vez foram encontrados ovócitos vitelogênicos (Figura 4). Estudos realizados por Wallace *et al.* (1993) sobre o crescimento *in vivo* do folículo ovariano do robalo-flecha indicam que a aplicação de hCG conduz a estágios mais avançados de desenvolvimento ovocitário. Zohar & Mylonas (2001) comentam que as fases iniciais da gonadogênese são mais bem estimuladas por preparações de gonadotrofina (GtH)

que pelo uso do hormônio liberador de gonadotrofina GnRH. Ohta *et al.* (1997) obtiveram maturação da enguia japonesa, *Anguilla japonica*, em cativeiro, através de protocolo de múltiplas doses de hormônio gonadotrófico, após aplicações semanais (9-12 semanas) de extrato de hipófise de salmão em fêmeas, e hCG em machos. A importância desse resultado relaciona-se ao fato de a espécie não apresentar nenhum sinal de desenvolvimento gonadal em condições de cativeiro. Pedersen (2003) descreve protocolo de até 24 semanas de injeções de extrato de hipófise de salmão para obtenção da maturação de enguia europeia, *Anguilla anguilla*.

Esse tipo de protocolo, baseado em múltiplas doses hormonais, pode não ser o mais adequado para peixes do porte do robalo-flecha. A cada semana, os animais foram submetidos a manejos de troca de água dos tanques, além de constantes anestésias para aplicação de hormônio. Nas fêmeas, ainda se realizou coleta de ovócitos antes de cada aplicação. Isso parece estar em acordo com o proposto por Mylonas *et al.* (2010), que consideram o estágio de desenvolvimento das gônadas no momento em que a terapia hormonal é aplicada, o tipo de terapia hormonal utilizado e o possível estresse provocado pela manipulação necessária para administração do hormônio, como os principais fatores que podem ter consequências significativas sobre a produção de gametas.

Para os machos do plantel, nesse novo ciclo reprodutivo, utilizou-se um protocolo que associou doses de uma variante do hormônio folículo estimulante FSH (Folltropin-V), a doses de hCG. Schulz & Miura (2002) comentam que o FSH é o hormônio mais importante na regulação de espermatogênese de peixes, e seu aumento na circulação pode ser suficiente para sinalizar o início do processo de espermatogênese e também para ativar as funções da célula de Sertoli e a produção de 11- ketotestosterona. Kamei *et al.* (2003) confirmam que o papel principal do FSH se encontra nas fases iniciais da espermatogênese e que em fases mais adiantadas ele não seria importante. De outro lado, Gen *et al.* (2003) sugerem que no macho do *red seabream*, *Pagrus major*, FSH e LH podem regular espermatogênese e espermição devido a elevações

na abundância para transcrição de unidades de FSH $\beta$  e LH $\beta$  durante a época de desova. Schulz *et al.* (2010) comentam que a função principal do FSH durante o início da proliferação das espermatogônias é estimular a produção de esteroides indutores da espermatogênese, como a 11 ketotestosterona, o principal andrógeno de peixes teleosteos.

Os resultados verificados para os machos do robalo-flecha no período reprodutivo de 2008/2009 não permitiram identificar nenhuma melhoria na maturação dos animais para as condições examinadas. A utilização de múltiplas doses de FSH + hCG ou apenas hCG não foram efetivas para a melhoria da produção de sêmen no período. Suquet *et al.* (1992) comentam que o efeito do estresse provocado pelo constante manejo e por coletas frequentes reduzem a quantidade e a qualidade do material coletado. Por outro lado, Tripell (2003) observa que uma determinação correta de avanço real dos estágios de maturação dos testículos só seria possível por meio de exames histológicos, o que não se pôde realizar com o lote de reprodutores utilizados no presente trabalho. Bobe & Labbé (2010) e Mylonas *et al.* (2010) relatam que no geral o manejo para animais em cativeiro pode ter efeito direto sobre a qualidade dos gametas na aquicultura e que a identificação de estimadores preventivos ou marcadores da qualidade dos gametas pode ser de grande auxílio no processo produtivo. No presente trabalho, o fato de os machos não ter respondido positivamente ao protocolo pode ser decorrente, pelo menos em parte, de todo o manejo realizado. Mesmo assim, a Tabela 1 mostra que o crescimento dos animais em peso e comprimento teve continuidade. O fator de condição bastante baixo pode indicar queda da condição nutricional desses animais e também um limitado desenvolvimento gonadal.

Outra questão importante diz respeito às doses utilizadas de FSH, as quais foram muito baixas quando comparadas às sugeridas para ovulação em bovinos (receituário Tecnopec). Neste ensaio, as doses utilizadas foram aproximadamente 10 vezes menores.

Pela análise dos dados do primeiro experimento, é possível concluir que o processo de espermição pode ser antecipado utilizando-se os implantes de 17 $\alpha$ -MT e 17 $\alpha$ -MT + LHRH, pois a

combinação do sistema de liberação prolongada com o tipo de hormônio incrementou a produção de sêmen um mês antes ao observado nos animais do controle. Entretanto, essa prática não pode ser considerada como solução definitiva para a maturação de machos de robalo-flecha.

No segundo experimento, os tratamentos crônicos de machos com FSH + hCG ou somente hCG não produziram efeito sobre a maturação. Já o tratamento crônico das fêmeas com hCG possibilitou o início da vitelogenese, porém não suficiente para levar a estágios mais avançados do processo.

Os resultados do presente trabalho representam informações importantes no estabelecimento de protocolos para o avanço da maturação de robalo-flecha em condições de laboratório. Entretanto, também indicam que novos protocolos para estimular a maturação, sobretudo de fêmeas, devem ser desenvolvidos utilizando fatores ambientais e/ou hormonais.

## AGRADECIMENTOS

Aos técnicos e colegas de trabalho do Laboratório; a José Luiz Pedreira Mourinho, pela ajuda nos tratamentos estatísticos; à colega Márcia Navarro Cipolli, pela leitura e sugestões; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Aizen, J.; Meiri, I.; Tzchori, I.; Levavi-Sivan, B. & Rosenfeld, H. (2005). Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1-2):212-21.
- Agulleiro, M.J.; Anguis, V.; Cañavate, J.P.; Martínez-Rodríguez, G.; Mylonas, C.C. & Cerda, J. (2006). Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. *Aquaculture*, 257(1-4):511-24.
- Bobe, J. & Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3):535-48.
- Bromage, N.; Porter, M. & Randall, C. (2001). The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture*, 197(1-4):63-98.
- Cabrita, E.; Soares, F. & Dinis, M.T. (2006). Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. *Aquaculture*, 261(3):967-75.
- Cerqueira, V.R. (2009). Spawning and larviculture of the fat snook (*Centropomus parallelus*) and the common snook (*Centropomus undecimalis*) in Brazil. *Abstracts do II International Symposium on the Biology and Culture of Snooks*, Villahermosa, México, 2009. v.1.
- Crim, L.W.; Evans, D.M. & Vickery, B.H. (1983). Manipulation of the seasonal reproductive cycle of the landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*) by LHRH analogues administered at various stages of gonadal development. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(1):61-7.
- Ferraz, E.M. & Cerqueira, V.R. (2010). Influência da temperatura na maturação gonadal de machos do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 36(2):73-83.
- Ferraz, E.M.; Alvarez-Lajonchère, L.; Cerqueira, V.R. & Candido, S. (2004). Validation of an ovarian biopsy method for monitoring oocyte development in the fat snook, *Centropomus parallelus* Poey, 1860 in captivity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(4):643-8.
- Ferraz, E.M.; Cerqueira, V.R.; Alvarez-Lajonchère, L. & Candido, S. (2002). Indução da desova do robalo-peva, *Centropomus parallelus*, através de injeção e implante de LHRHa. *Boletim do Instituto de Pesca*, 28(2):125-33.
- Fraga, I.; Reyes, R.; Ortega, N.J.; Rigueira, E.; Font, R. & Bravo, A. (2006). Desarrollo de un banco de reproductores de Róbalo (*Centropomus undecimalis* Bloch, 1792): I. Manejo del alimento. IV Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura Civa, Comunicación Científica p.1-9, Disponible en: <http://www.civa2006.org>. (acceso em: 20 set. 2007).
- Gen, K.; Yamaguchi, S.; Okuzawa, K.; Kumakura, N.; Tanaka, H. & Kagawa, H. (2003). Physiological roles of FSH and LH in red seabream, *Pagrus major*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1-4):77-80.
- Grier, H.J. & Taylor, R.G. (1998). Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology*, 53(3):521-42.
- Grier, H. (2000). Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *Journal of Morphology*, 243(3):265-81.
- Hassin, S.; Holland, M.C.H. & Zohar, Y. (2000). Early maturity in the male striped bass, *Morone saxatilis*: follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression and their regulation by gonadotropin-releasing hormone analogue and testosterone. *Biology of Reproduction*, 63(6):1691-7.
- Henry, J.C.; McLean, E.; Mayer, I. & Donaldson, E.M. (1998). Induction of precocious maturation in masculinized

- Atlantic salmon by treatment with sustained-release LHRHa and testosterone, *Aquaculture International*, 6(4):261-8.
- Hernandez-Rauda, R. & Aldegunde, M. (2002). Effects of acute 17 $\alpha$ -methyltestosterone, acute 17 $\beta$ -estradiol, and chronic 17 $\alpha$ -methyltestosterone on dopamine, norepinephrine and serotonin levels in the pituitary, hypothalamus and telencephalon of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Comparative Physiology B*, 172(8):659-67.
- Holland, M.C.H.; Hassin, S. & Zohar, Y. (2002). The effects of long-term testosterone, gonadotropin-releasing hormone agonist and pimoziol treatments on testicular development and luteinizing hormone levels in juvenile and early maturing striped bass, *Morone saxatilis*. *General and Comparative Endocrinology*, 129(3):178-87.
- Kamei, H.; Oshira, T.; Yoshiura, Y., Uchida, N. & Aida, K. (2003). Androgen secretion activity of recombinant follicle-stimulating hormone of Japanese eel, *Anguilla japonica* in immature and maturing eel testes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1-4):97-8.
- McGuren, J.; Garrett, R. & Elizur, A. (2005). Hormone implants accelerate maturation in barramundi. The State of Queensland (Department of Primary Industries and Fisheries). Available from: <www.dpi.qld.gov.au/aquaculturenews/#nav1>. Cited 20 March 2005.
- Mylonas, C.C. & Zohar, Y. (2001). Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10(4):463-91.
- Mylonas, C.C.; Papadaki, M. & Divanach, P. (2003). Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). *Aquaculture Research*, 34(13):1161-70.
- Mylonas, C.C.; Fostier, A. & Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3):516-34.
- Neiding, C.L.; Skapura, D.P.; Grier, H.J. & Dennis, C.W. (2000). Techniques for spawning common snook: broodstock handling, oocyte staging, and egg quality. *North American Journal of Aquaculture*, 62(2):103-13.
- Ohta, H.; Kagawa, H.; Tanaka, H.; Okuzawa, K.; Iinuma, N. & Hirose, K. (1997). Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 17(1-6):163-9.
- Pedersen, B.H. (2003). Induced sexual maturation of the European eel, *Anguilla anguilla*, and fertilization of the eggs. *Aquaculture*, 224(1-4):323-38.
- Rainis, S.; Mylonas, C.C.; Kyriakou, Y. & Divanach, P. (2003). Enhancement of spermiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at the end of the reproductive season using GnRHa implants. *Aquaculture*, 219(1-4):873-90.
- Reyes, R.; Ramos, D.; Fraga, I.; Galindo, J. & Ortega, N. (2004). Creación de un banco de progenitores de Róbalo, *Centropomus undecimalis* Bloch. Comunicación Científica do III Congreso Iberoamericano Virtual De Acuicultura p.814-820. Disponible: <http://www.civa2004.org> (Acceso en: 10 mar 2006).
- Roberts, S.B.; Jackson, L.P.; King, W.; Taylor, R.G.; Grier, H.J. & Sullivan, C.V. (1999). Annual reproductive cycle of the common snook: endocrine correlates of maturation. *Transactions of the American Fisheries Society*, 128(3):436-45.
- Schulz, R.W. & Miura, T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1):43-56.
- Schulz, R.W.; França, L.R.; Lareyre, J.-J.; Legac, F.; Chiarini-Garcia, H.; Nóbrega, R.H. et al. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3):390-411.
- Soligo, T.A.; Ferraz, E.M.; Cerqueira, V.R. & Tsuzuki, M.Y. (2008). Primeira experiência de indução hormonal, desova e larvicultura do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, no Brasil. In: Cyrino, J.E.P., Scorvo Filho, J.D., Sampaio, L.A. & Cavalli, R.O. (Ed.). *Tópicos especiais em biologia aquática e aqüicultura II*. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática. p.143-52.
- Suquet, M.; Omnes, M.H.; Norma, Y. & Fauvel, C. (1992). Influence of photoperiod, frequency of stripping and presence of females on sperm output in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquatic Fish Management*, 23(2):217-25.
- Tiba, R.M.; Oliveira, I.R.; Serralheiro, P.C.S. & Ostini, S. (2009). Diluentes e proporções sêmen:diluyente na criopreservação do sêmen de robalo-peva, *Centropomus parallelus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 35(1):99-110.
- Trippel, E.A. (2003). Estimation of male reproductive success of marine fish. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 33(1):81-113.
- Wallace, R.A.; Boyle, S.M.; Grier, H.J.; Selman, K. & Petrino, T.R. (1993). Preliminary observations on oocyte maturation and other aspects of reproductive biology in captive female snook. *Centropomus undecimalis*. *Aquaculture*, 116(2-3):257-73.
- Yaron, Z. & Levavi-Sivan, B. (2006). Fish reproduction. In: Evans, D.H. & Clairbourne, J.B. (Ed.). *The physiology of fishes*. 3<sup>ed</sup>. Boca Raton: RC Press, Taylor and Francis. p.345-88.
- Zanuy, S.; Carrillo, M.; Mateos, J.; Trudeau, V. & Kah, O. (1999). Effects of sustained administration of testosterone in prepuberal sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 177(1-4):21-35.
- Zohar, Y. & Mylonas, C.C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197(1-4):99-136.

Recebido em: 1/4/2011

Versão final reapresentada em: 3/6/2011

Aprovado em: 28/9/2011