

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - FCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E RECURSOS
PESQUEIROS - PPGCARP

TESE DE DOUTORADO

Efeitos de hormônios sintéticos na desova, níveis plasmáticos de esteroides sexuais e transcrição de gonadotrofinas em *Colossoma macropomum* maduros e avaliação econômica do seu uso na produção de larvas da espécie

ROSILANE GOMES DE SOUZA DE OLIVEIRA

MANAUS - AM

2022

ROSILANE GOMES DE SOUZA DE OLIVEIRA

Efeitos de hormônios sintéticos na desova, níveis plasmáticos de esteroides sexuais e transcrição de gonadotrofinas em *Collossoma macropomum* maduros e avaliação econômica do seu uso na produção de larvas da espécie

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração: Produção Animal.

ORIENTADOR: Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan

COORIENTADORA: Dr^a Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan

MANAUS-AM

2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira, Rosilane Gomes de Souza de
O48e Efeitos de hormônios sintéticos na desova, níveis plasmáticos de esteroides sexuais e transcrição de gonadotrofinas em *Colossoma macropomum* maduros e avaliação econômica do seu uso na produção de larvas da espécie / Rosilane Gomes de Souza de Oliveira . 2022
87 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Wallice Luiz Paxiúba Duncan
Coorientadora: Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan
Tese (Doutorado em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Extrato hipofisário. 2. GnRH α . 3. Fsh β . 4. Lh β . 5.
Tambaqui. I. Duncan, Wallice Luiz Paxiúba. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

ROSILANE GOMES DE SOUZA DE OLIVEIRA

Efeitos de hormônios sintéticos na desova, níveis plasmáticos de esteroides sexuais, transcrição de gonadotrofinas em *Colossoma macropomum* maduros e avaliação econômica do seu uso na produção de larvas da espécie

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração em Produção Animal.

Aprovada em 31 de janeiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA



Wallace L. Paxiúba Duncan
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Wallace Luiz Paxiúba Duncan - Presidente
Universidade Federal do Amazonas



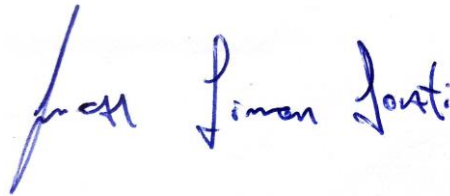
Dr. Luis David Solis Murgas - Membro
Universidade Federal de Lavras



Dr. Alexandre Ninhaus Silveira - Membro
Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho



Dra. Luciana Nakaghi Ganeco Kirschnik - Membro
EMBRAPA Pesca e Aquicultura



Dr. Lucas Simon Torati - Membro
EMBRAPA Pesca e Aquicultura

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, a DEUS, Doador da Vida, Supremo Criador do Universo!

A minha Orientadora, Dr^a Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan, pela oportunidade, ensinamentos, confiança, condução e suporte durante esse período, com muito entusiasmo.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan, pela transição institucional para o novo programa PPGCARP e contribuições neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animal e Recursos Pesqueiros - PPGCARP da Universidade Federal do Amazonas e às Coordenadoras Professoras Dr^a Kedma Yamamoto e Dr^a Flavia Souza, pelos conselhos oferecidos.

À Embrapa Amazônia Ocidental, pela logística, laboratórios, transporte e por todo suporte oferecido para que eu pudesse desenvolver e obter a formação do doutorado; Ao Dr Gilvan Ferreira da Silva, chefe do Laboratório de Biologia Molecular, onde foi desenvolvido parte do estudo.

Aos funcionários da Estação de Piscicultura de Balbina (CTTPA), coordenada pelo Msc. José Baracho, onde realizei o experimento do Capítulo 1. Agradeço especialmente ao Msc Ronãn Freitas que me ajudou demais durante aquele período.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos; à Fundação de apoio à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) pelo auxílio advindo do “Amazonas Estratégico” e à Embrapa pelo auxílio do projeto “Portfólio de Aquicultura”.

Aos Doutores membros da banca de defesa, pelas valiosas contribuições.

Às amigas que fiz no laboratório e no campo, sem as quais seria impossível realizar os experimentos: Irani Moraes, Vanessa Reis, Aldessandro Amaral, Gabriela Brambila, Rômulo Paixão, Karina Bichara, Jefferson Cruz, Izabel Bandeira, Daniel Ariki e tantos outros que foram importantes na realização deste trabalho.

A minha família: Ao meu esposo Arley, meu amigo de todas as horas e meu grande incentivador dos trabalhos de pesquisa; aos meus filhos, Ayra e Gabriel, que são minha inspiração e compreenderam minha ausência durante esse período.

Aos meus pais, Leci e Edna, por me conduzirem em excelente caminho; As minhas irmãs, Renata e Cintia, meus sobrinhos, Davi, Jonatas, Felipe, Rafael. Todos distantes, mas muito importantes na minha vida.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse episódio na minha vida profissional.

Muito obrigada!

RESUMO

A produção comercial de tambaqui *Colossoma macropomum* pode ser considerada uma atividade pecuária em desenvolvimento no Brasil e América do Sul. E por esta razão, apresenta ainda desafios a serem superados, inerentes à consolidação de qualquer indústria zootécnica incipiente, em sua constante busca por alta produtividade com sustentabilidade. Dentre os desafios, figura a busca por produtos comerciais a serem utilizados na reprodução da espécie, garantindo o suprimento de todo o ciclo de engorda em cativeiro. Isto porque desde sua domesticação, a produção de tambaqui sempre se baseou no uso de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), um produto biológico artesanal que representa um risco de veiculação de doenças, e que, por este e outros motivos está sendo cada vez mais condenado pelo órgãos reguladores de produtos pecuários. O grande obstáculo hoje, e que tem sido alvo de vários estudos em diferentes espécies nativas brasileiras, é identificar um produto sintético (e portanto sem risco biológico) com a mesma eficácia que o EBHC, cuja eficiência em induzir a maturação final dos oócitos e ovulação em peixes reofílicos é inquestionável. Esta temática fundamenta a relevância desta tese. O objetivo deste trabalho foi testar diferentes análogos sintéticos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH_a), disponíveis comercialmente, na indução de tambaqui, verificar seus efeitos nos índices qualitativos e quantitativos da desova das fêmeas, na produção de esteroides sexuais, na síntese de gonadotrofinas em hipófises de machos e fêmeas maduras, e, por fim avaliar seus custos no uso como indutores reprodutivos para tambaqui. Os resultados apontam estes compostos como alternativos para indução reprodutiva de tambaqui, uma vez que os índices de desova e sobrevivência embrionária, bem como os hormônios plasmáticos investigados foram semelhantes em fêmeas tratadas com estes compostos (em doses únicas) e tratadas com EBHC (duas doses intervaladas de 12 horas). No entanto, nem todas as fêmeas tratadas com GnRH_a desovaram, ao contrário das fêmeas que foram induzidas com EBHC. Uma única dose de gonadorelina (GnRH_a) induz ao aumento na expressão de *lhβ*, ao mesmo tempo em que reduz a transcrição de *fshβ*. A análise dos custos na produção larval de tambaqui indica que a buserelina é o tratamento mais acessível, porém, o que resulta em índice de desova mais baixo. Como os análogos aqui testados promoveram o aumento da expressão de Lh, estimulando desovas com alta qualidade e quantidade de ovos, mais estudos se fazem necessários na otimização de suas dosagens com objetivo de alcançar altos índices de desova, ao mesmo tempo em que os custos envolvidos nesta prática devem ser sempre considerados, para que as novas tecnologias sejam viáveis ao setor produtivo, maior beneficiário dessas pesquisas.

Palavras-chave: extrato hipofisário GnRH_a. Fshβ. Lhβ. Economia. tambaqui.

ABSTRACT

The commercial production of tambaqui *Colossoma macropomum* can be considered a livestock activity in development in Brazil and South America. For this reason, it still presents challenges to overcome, inherent to the consolidation of any incipient zootechnical industry, in its constant search for high productivity with sustainability. Among the challenges, stands the search for commercial products to be used in the reproduction of the species, ensuring the supply of the entire production chain. This is because since its domestication, the production of tambaqui has been based on the use of crude carp pituitary extract (CPE), a biological product that represents a risk of spreading disease, and which, for this and other reasons, is being condemned by the regulatory organs of livestock products. The great challenge today, and which has been the subject of several studies in different Brazilian native species, is to identify a synthetic product (and therefore without biological risk) with the same efficacy as CPE, whose efficiency in inducing the final maturation of oocytes and ovulation in rheophilic fish is unquestionable. This theme underlies the relevance of this thesis. The objective of this work was to test different commercially available synthetic analogues of gonadotropin releasing hormone (GnRH_a) in tambaqui reproduction, to verify their effects on the qualitative and quantitative indexes of strip-spawning, sex steroid production, gonadotropin synthesis in the pituitary of mature males and females, and finally, to assess the costs of their use as reproductive inducers for tambaqui. The results point to these compounds as alternative hormones for the artificial reproduction of tambaqui, since the spawning and embryonic survival rates, as well as the investigated plasma hormones were similar in females treated with these compounds (in single doses) and treated with the traditional CPE (two doses 12 hours apart). However, not all females treated with GnRH_a spawned, unlike females that were induced with CPE. A single dose of gonadorelin (mGnRH_a) up regulates *lhβ* expression while reducing *fshβ* transcription. The analysis of the costs of tambaqui larval production indicates that buserelin is very economic, however it provoked the lowest spawning index. As the analogues tested here promoted increased Lh expression, stimulated spawning with high quality and quantity of eggs, further studies are needed to optimize their dosages in order to achieve high spawning rates, at the same time as the costs involved in this practice must be considered, so that new technologies are viable for the industry, the main beneficiary of these researches.

Keywords: pituitary extracts. GnRH_a. Fshβ. Lhβ. Economy. tambaqui.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	11
CAPÍTULO I	13
Reprodução de peixes em cativeiro: uma revisão	13
1. Produção aquícola mundial e nacional.....	14
2. Fisiologia Reprodutiva de Peixes Teleósteos	15
2.1. Controle da reprodução de peixes em cativeiro	18
2.2. Hormônios exógenos na indução reprodutiva	19
2.2.1. Hipófise de peixes maduros.....	19
2.2.2. Gonadotrofina coriônica humana (HCG)	20
2.2.3. Análogos de GnRH.....	20
2.2.4. Acetato de buserelina	22
2.2.5. Gonadorelina	22
2.2.6. Método “Linpe”.....	23
2.2.7. Implantes de GnRH	23
2.2.8. Pesquisas sobre hormônios sintéticos	24
3. O Tambaqui.....	27
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO II	34
Effects of GnRH analogues on strip spawning and steroid levels of <i>Colossoma macropomum</i>	34
1. Introduction	37
2. Material and methods	39
2.1. Experiment location, management and selection of animals.....	39
2.3. Treatments	40
2.4. Accumulated thermal units, stripping and fertilization	41
2.5. Analysis of spawning rate, egg quality and viability.....	42
2.6. Analysis of 17 β -estradiol, 17 α OHP and 17 α 20 β P plasma levels	42
2.7. Statistical analysis.....	43
3. Results	44
3.1. Condition factor, spawning rate and degree hour for strip spawning.....	44
3.2. Egg quantity and quality.....	44
3.3. Plasma level of 17 β -estradiol, 17 α OHP and 17 α 20 β P.....	46
4. Discussion	48
5. Conclusion	51
References	52
CAPÍTULO III	60

Effects of gonadorelin on the expression of <i>fshβ</i> and <i>lhβ</i> in mature male and female tambaqui <i>Colossoma macropomum</i>.....	60
1. Introduction	63
2. Material and methods.....	65
2.1. Management and selection of animals	65
2.2. Hormonal treatment.....	65
2.3. Sampling	66
2.4. RT-qPCR.....	66
2.5. Statistical analysis	67
3. Results	67
3.1. Biometrical indexes	67
3.2. Relative expression of <i>fshβ</i> and <i>lhβ</i>	68
4. Discussion	69
References.....	71
CAPÍTULO IV.....	75
Análise de custo-benefício do uso de extrato hipofisário de carpa e de análogos de GnRH na desova induzida de tambaqui <i>Colossoma macropomum</i>.....	75
Introdução.....	78
Material e métodos.....	79
<i>Manutenção dos animais, tratamentos hormonais e reprodução artificial.....</i>	<i>79</i>
<i>Levantamento de custos dos compostos e dos indicadores de eficiência</i>	<i>80</i>
Resultados.....	81
Discussão	82
Referências.....	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS	87

APRESENTAÇÃO

Em aquicultura, as formas jovens constituem um insumo fundamental na cadeia produtiva de qualquer espécie. Para garantir o suprimento de todo o ciclo de engorda de espécies mantidas em cativeiro, são utilizados hormônios exógenos na indução reprodutiva de peixes que não se reproduzem espontaneamente.

A produção comercial de tambaqui *Colossoma macropomum* pode ser considerada uma atividade pecuária em desenvolvimento no Brasil e América do Sul. E por esta razão, apresenta ainda desafios a serem superados, inerentes à consolidação de qualquer indústria zootécnica incipiente, em sua constante busca por alta produtividade com sustentabilidade.

Desde a sua domesticação até os dias atuais, a produção de tambaqui se sustenta no uso de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), um produto biológico artesanal que representa um risco de veiculação de doenças, e que, por este e outros motivos está sendo cada vez mais condenado pelo órgãos reguladores de produtos pecuários. Assim, o grande desafio é identificar um produto sintético com a mesma eficácia que o EBHC, cuja eficiência em induzir a maturação final dos oócitos e ovulação em muitos peixes reofílicos é inquestionável. Esta temática fundamenta a relevância desta tese.

Por estas razões mencionadas, o objetivo deste trabalho foi testar diferentes análogos sintéticos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH_a), disponíveis comercialmente, na indução de tambaqui, avaliar seus efeitos na concentração plasmática de esteroides sexuais, na transcrição de gonadotrofinas em hipófises de machos e fêmeas maduras, e, por fim avaliar seus custos como indutores reprodutivos para tambaqui.

Os resultados aqui apresentados estão distribuídos em capítulos, em formato de artigos científicos, que correspondem a cada objetivo específico do trabalho. O capítulo I é constituído por uma revisão de literatura sobre panorama da produção aquícola, fisiologia reprodutiva de peixes e o controle da reprodução através de hormônios exógenos na aquicultura.

O capítulo II apresenta nossos resultados sobre a eficiência dos análogos sintéticos, sobre os índices reprodutivos de fêmeas de tambaqui e aspectos da sua fisiologia reprodutiva, quantificando níveis plasmáticos dos hormônios E₂, 17 α -OHP antes da aplicação dos indutores e após a desova e também as primeiras informações sobre níveis plasmáticos de 17 α , 20 β -DHP.

O capítulo III trata dos estudos sobre a análise da expressão gênica de *fsh β* e *lh β* através de RT-qPCR em machos e fêmeas de tambaqui maduros não tratados, considerados controle, e tratados com um análogo de GnRH (gonadorelina).

E, finalmente, o capítulo IV expõe as análises do custo-benefício de cada composto avaliado no capítulo II, incluindo o extrato bruto de hipófise de carpa, para a produção de larvas de tambaqui.

CAPÍTULO I

Reprodução de peixes em cativeiro: uma revisão

A ser submetido à Revista *Reviews in Aquaculture*

1. Produção aquícola mundial e nacional

A aquicultura é considerada uma importante indústria global, com produção total de 114,5 milhões de toneladas em 2018, sendo 82,1 milhões de toneladas somente de animais aquáticos, com valor estimado em US \$263,6 bilhões (FAO, 2020). A aquicultura continental produziu 51,3 milhões de toneladas, o que correspondeu a 62,5% da produção mundial naquele ano. Em relação a produção por continentes, a Ásia domina a produção aquícola mundial, respondendo por 92% do volume do peso vivo de animais e algas marinhas. A China sozinha responde por 57,8% desta produção (FAO, 2020). Nas últimas três décadas, a indústria da aquicultura fez progressos impressionantes, respondendo por 52% dos peixes para consumo humano e por um sexto da ingestão mundial de proteína animal. Além de fornecer proteína de alta qualidade, a aquicultura ainda contribui com a geração de empregos e renda (FAO, 2020).

Neste cenário global, o Brasil ocupa a 13ª posição na produção de peixes em cativeiro e é o 8º país em produção de peixes de água doce (FAO, 2020). A produção nacional da aquicultura brasileira em 2020 atingiu 803 mil toneladas, com receita de aproximadamente R\$ 8 bilhões, e geração de mais de 1 milhão de empregos diretos e indiretos. O Brasil é ainda o quarto maior produtor mundial de tilápia, espécie que representa 60,6% da produção nacional. Os peixes nativos, liderados pelo tambaqui, participam com 35% e outras espécies com 5%. Ao longo dos últimos anos, a produção brasileira de peixes em piscicultura teve um aumento de 38,7%, passando de 579 mil ton em 2014 a 803 mil ton em 2020 (Peixe BR, 2021).

Atualmente a região Sul lidera a produção aquícola brasileira (31%), seguida do Norte (20%), Nordeste (18,8%), Sudeste (17%) e Centro-Oeste (13,9%). Os três Estados maiores produtores são o Paraná, São Paulo e Rondônia (Peixe BR, 2021).

Em 2020, as espécies mais exportadas pelo Brasil foram a tilápia, com receita de US\$ 10,3 milhões, o curimatá (US\$ 602 mil) e o tambaqui (US\$ 562 mil), tendo esse último apresentado um aumento de 648,6% comparado a 2019 (Peixe BR, 2021). Estes dados indicam que espécies nativas começam finalmente a ganhar atenção no mercado internacional de peixes para consumo humano. Vale ressaltar também, que o Brasil importou mais de 322 toneladas de pescado em 2019, sendo o salmão, a espécie que representou 30% desse montante (Pedroza-Filho e Rocha, 2020). No mercado interno, comparado às outras fontes de proteína animal, o consumo de peixes de cultivo per capita é inferior a 4 kg/hab/ano, enquanto que o de frangos supera 42 kg/hab/ano, o de carne bovina está acima de 30 kg/hab/ano e o de carne suína 15 kg/hab/ano (Peixe BR, 2021).

Mesmo com esse aumento constante na produção aquícola a cada ano, e crescimento nos índices de exportação, o Brasil tem condições naturais suficientes para aumentar muito mais sua produção aquícola e se tornar um grande produtor mundial de pescado. O país possui costa marinha de 8.500 km de extensão e 12% da água doce disponível do planeta; grande volume d'água em reservatórios e de água subterrânea; condições climáticas favoráveis; alta disponibilidade de mão de obra; e características ambientais propícias à produção intensiva em mar aberto ou na região costeira (Ximenes, 2021).

Em geral, a aquicultura brasileira se baseia no cultivo de 64 espécies, sendo poucas as cultivadas com tecnologias de produção adequadas para otimizar a produção (Calixto et al. 2020). Da mesma forma, a mecanização da produção e reutilização de subprodutos ainda é raro na aquicultura brasileira, sendo apenas observadas em poucas fazendas, geralmente de grande porte e produção intensiva. Na região Norte, as espécies nativas são as mais produzidas, sendo o tambaqui, pirapitinga, tambatinga e pirarucu as espécies mais produzidas. Nas regiões Sul e Sudeste, a tilápia é o peixe mais cultivado, representando, ambas, 71,4% da tilapicultura nacional. No Nordeste e Centro-Oeste, a tilapicultura representa 17,5% e 11% da produção, respectivamente (Peixe BR, 2021). Para a maioria das espécies de peixes exploradas em cultivo no Brasil, ainda existe a necessidade de pesquisas básicas sobre a biologia reprodutiva ou o domínio das técnicas de reprodução em cativeiro. Além disso, ainda existem muitas outras espécies ainda não cultivadas, porém com alto potencial para a aquicultura.

2. Fisiologia Reprodutiva de Peixes Teleósteos

Os teleósteos representam o maior grupo de vertebrados e habitam os mais diferentes ambientes naturais, de altas altitudes a águas tropicais, passando ainda por diferentes graus de salinidade. Da mesma forma, as estratégias reprodutivas adotadas são específicas e asseguram a sobrevivência natural de cada espécie considerada. Assim, existem diversos comportamentos reprodutivos, migrações, agressões, sons, tipos de acasalamento e de cuidados parentais. Os gametas das diferentes espécies de peixes também tem suas peculiaridades, estruturas, moléculas de superfície e mecanismo de fertilização (Baylis, 1978).

Entretanto, os processos biológicos envolvidos na maturação gonadal e produção de gametas são muito bem conservados dentre as espécies de peixes. Assim como em todos os vertebrados, nos peixes a reprodução é regulada por mecanismos endógenos que, aliados a

estímulos ambientais, influenciam o processo de recrutamento e maturação das células germinativas primordiais, oogônias e espermatogônias, culminando com a liberação dos gametas maduros e férteis, oócitos e espermatozóides (Zohar *et al.*, 2010).

Embora a duração da gametogênese seja espécie-específica, a maioria dos teleósteos apresenta maturação sazonal, onde fatores abióticos, como fotoperíodo, temperatura, propriedades da água ou oferta de alimentos, exercem efeitos e portanto regulam a sua fisiologia reprodutiva. Esses componentes são percebidos pelo sistema nervoso central e acionam neuromodulações no eixo reprodutivo, conhecido por eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, levando ao estímulo ou inibição da maturação sexual. O eixo hipotálamo-hipófise-gônadas é composto pelo sistema nervoso central, representado pelo hipotálamo, pela glândula hipófise e gônadas, e rege de forma sincrônica todos os eventos endócrinos envolvidos na função gonadal dos peixes (Schulz e Miura, 2002), inclusive para suprimi-la quando as condições são desfavoráveis à reprodução e/ou sobrevivência das larvas. Desta forma, este eixo regula as atividades do sistema reprodutivo de acordo com as condições ambientais e as condições fisiológicas do indivíduo (Schulz e Miura, 2002). Esta estreita relação com sinais ambientais asseguram que a eclosão dos ovos e o desenvolvimento larval ocorram em época e condições favoráveis à sobrevivência da prole.

A ativação do eixo se dá quando condições ambientais favoráveis são percebidas pelo sistema nervoso central, resultando na síntese do hormônio liberador de gonadotrofinas (gonadotropin-releasing hormone - GnRH) pelo hipotálamo. Esse neuro-hormônio é produzido por neurônios da porção ventral do hipotálamo que inervam diretamente a hipófise com seus axônios, cujas terminações ficam próximas às células gonadotróficas presentes no lobo anterior desta glândula (Dubois *et al.*, 2002). Uma vez liberado dos axônios, o GnRH atua diretamente nas células gonadotróficas da hipófise, glândula endócrina localizada na parte ventral do cérebro, estimulando a síntese e liberação das gonadotrofinas (Gths) (Peter e Yu, 1997), o Hormônio folículo estimulante, FSH (do inglês Follicle Stimulating Hormone) e o Hormônio Luteinizante, LH (do inglês Luteinizing hormone). Além das Gths, outros hormônios também são produzidos pela hipófise, estando envolvidos no crescimento, metabolismo e adaptação ao estresse (Mañanós, Duncan e Mylonas, 2008).

Como resposta primária à liberação de GnRH na hipófise, ocorre a síntese e liberação de Fsh, que desencadeia o início da maturação gonadal de machos e fêmeas e, mais tardiamente, a síntese e secreção de Lh, responsável pelos estímulos finais da maturação de ovários e

testículos. Nas fêmeas, via ativação de seus receptores, o Fsh desencadeia o crescimento do oócito e desenvolvimento folicular e a síntese pelas células da granulosa da aromatase, enzima que converte a testosterona produzida pelas células da teca em estradiol. O estradiol, por sua vez, atinge a circulação sanguínea e estimula a síntese hepática de vitelogenina, através da ligação e ativação dos receptores de estradiol presentes no fígado. A vitelogenina é carregada pela circulação, captada e englobada nos oócitos, processo conhecido por vitelogênese ou acúmulo de vitelo nos oócitos, causando o crescimento dos mesmos (Revisado em Almeida, 2013).

Na segunda fase da foliculogênese, o Lh é liberado pela hipófise e estimula as células foliculares a produzirem o progestágeno $17\alpha,20\beta$ -DP, mais conhecido por hormônio esteroide indutor da maturação (MIS, do inglês Maturation Inducing Steroid), que se liga a seus receptores na superfície citoplasmática do oócito, promovendo a ativação citoplasmática do fator promotor da maturação (MPF). Vários processos celulares são, enfim, desencadeados pelo MPF nos oócitos, dentre eles quebra da vesícula germinativa, retomada da meiose, condensação cromossômica, formação do fuso e liberação do primeiro corpúsculo polar, caracterizando a maturação final (Nagahama e Yamashita, 2008). Quando a maturação folicular finalmente termina, ocorre a ovulação e liberação do oócito do folículo. Vale ressaltar que as prostaglandinas também exercem importante papel na maturação final e ovulação em muitas espécies de peixes (Lister e Van Der Kraak, 2008).

Nos machos, o Fsh é responsável, via estímulos das células de Sertoli que expressam os receptores para Fsh, pela proliferação espermatogonial que representa a primeira fase da espermatogênese. Ao mesmo tempo, o Fsh ativa também os receptores presentes nas membranas das células de Leydig (principal célula esteroidogênica do testículo), estimulando o início da síntese e secreção de andrógenos (Ohta *et al.*, 2007). Nessa fase inicial, a testosterona é o principal andrógeno produzido pelos testículos dos peixes, e desempenha funções importantes nesta fase proliferativa das espermatogônias, embora indiretamente, prevenindo a apoptose das células germinativas durante as primeiras divisões celulares (via receptores de andrógenos presentes nas próprias células de Sertoli; Almeida, 2013). Essa atividade esteroidogênica do Fsh é uma particularidade dos peixes que se pronuncia com o avançar da meiose. Após a meiose e próximo à maturação final, com a espermiogênese e liberação dos espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos, a 11-cetotestosterona (11-KT), andrógeno não aromatizável, se torna o principal andrógeno produzido pelos testículos dos peixes. A 11-KT é muito importante para o comportamento reprodutivo dos machos na maioria dos

teleósteos. Também nos machos a progesterona desempenha funções durante a maturação final, estimulando a meiose, espermiogênese e hidratação dos espermatozoides.

Após a desova e encerramento das atividades reprodutivas, Fsh, Lh e esteróides sexuais retornam aos seus níveis basais que, em muitas espécies de peixes, significam valores quase nulos ou indetectáveis (Almeida, 2013). Esta fase se caracteriza por baixa ou nenhuma atividade gonadal e é conhecida por descanso ou repouso reprodutivo. O tamanho de ovários e testículos se reduzem a valores mínimos neste período.

Da mesma forma que o GnRH regula a reprodução, na qualidade de integrador de informações externas e respostas fisiológicas endógenas, em algumas espécies de peixes existe outro neuromodulador secretado pelo hipotálamo, a dopamina (DA), que exerce efeito bloqueador sobre a liberação das gonadotrofinas (Mylonas, Fostier e Zanuy, 2010). A dopamina em alguns peixes atua diretamente na hipófise, inibindo a liberação basal de Gths e atenuando a ação do GnRH sobre as células gonadotróficas (Zohar e Mylonas, 2001).

2.1. Controle da reprodução de peixes em cativeiro

Assim como em toda atividade pecuária, na produção comercial de peixes o controle da reprodução em cativeiro é condição fundamental para o fomento de toda a cadeia. Entretanto, em algumas espécies de peixes, a reprodução em cativeiro não é fácil de ser praticada e a maioria dos peixes não apresenta atividade reprodutiva completa. Isso porque, como explicado anteriormente, os estímulos ambientais desempenham um papel fundamental no início da maturação gonadal dos peixes. Por exemplo, as espécies reofílicas tropicais necessitam realizar migração reprodutiva rio acima para desenvolver as gônadas e completar a maturação final e desova na natureza. Se em ambiente natural a reprodução dos peixes é regulada por mecanismos endógenos que, aliados a estímulos ambientais, influenciam o processo de maturação dos gametas (Zohar *et al.*, 2010), o mesmo não ocorre em condições de cultivo especificamente pela falta dos estímulos ambientais. Nestes casos, os indivíduos atingem a maturidade reprodutiva, mas as fêmeas não completam a maturação final dos oócitos e os machos emitem pouco ou nenhum sêmen, sendo necessária a indução hormonal exógena (Zohar *et al.*, 2010).

A falta dos estímulos ambientais gera uma falha da hipófise principalmente na secreção de Lh (Lin e Peter, 1996). As fases iniciais da maturação de ovários e testículos, estimuladas pelo Fsh, ocorrem normalmente, porém as etapas finais da gametogênese, dependentes de LH,

são bloqueadas. Deste modo, para se conseguir a maturação final dos gametas, se faz necessário o uso de substâncias endócrinas ou de efeitos endócrinos, que ajam em qualquer nível do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, estimulando a maturação final (Mylonas, Fostier e Zanuy, 2010).

2.2. Hormônios exógenos na indução reprodutiva

O desenvolvimento de técnicas para induzir a reprodução em peixes representou um grande avanço na aquicultura. A reprodução artificial de peixes se tornou possível pela manipulação do ambiente, ou pela administração de hormônios exógenos para estimular a desova.

2.2.1. Hipófise de peixes maduros

Os primeiros estudos sobre a importância do lóbulo anterior da hipófise na atividade sexual dos peixes neotropicais foram coordenados pelo argentino Bernardo Alberto Houssay em 1930. Em seguida, no Brasil, Rudolf Von Ihering e colaboradores, desenvolveram a técnica conhecida como hipofiseação e conduziram experimentos com várias injeções hormonais baseados nos estudos de Houssay, alcançando sucesso em 1934 (Von Ihering, 1937).

As hipófises de peixes maduros (comumente de carpa comum *Cyprinus carpio carpio*) possuem elevadas concentrações de Lh e portanto atuam diretamente sobre as gônadas do peixe receptor, promovendo a maturação final dos oócitos (Nagahama e Yamashita, 2008; Mylonas, Fostier e Zanuy, 2010).

Embora existam alguns problemas no uso de extratos hipofisários, como a sua impureza hormonal (a hipófise produz diferentes hormônios glicoproteicos, com diversas ações sistêmicas), especificidade, continuidade de suprimento (Aizen *et al.*, 2017), potência e segurança microbiológica (Donaldson e Hunter, 1983), a alta eficiência da hipófise faz com que este composto seja, até hoje, extensivamente utilizado na reprodução de peixes no Brasil e em outros países.

Devido ao *outbreak* do herpesvírus ciprinídeo 3 (CyHV-3) que afeta pelo menos duas espécies, a carpa comum e a carpa ornamental “koi”, houve uma escassez de glândulas hipofisárias de carpa no mercado internacional (Davidovich *et al.*, 2007). A incidência desta virose que tem devastado a produção de carpa em todo o mundo (Boutier *et al.*, 2015) motivou

o estabelecimento de uma restrição legal para importação de hipófises frescas e processadas em vários países (Aizen *et al.*, 2017).

No estado de Minas Gerais, existe uma limitação através da instrução normativa imposta pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (artigo 4º e 5º), proibindo o ingresso de qualquer produto, subprodutos, despojos de animais aquáticos, vísceras, alimento vivo ou qualquer outro material presumível veiculador de agente etiológico de doenças contagiosas, restringindo assim a utilização do extrato hipofisário, EBHC apenas a estudos científicos (Instrução Normativa SDA nº 53 de 02/07/2003).

Esse cenário demonstra a urgente necessidade de pesquisas com hormônios sintéticos substitutivos para a indução reprodutiva de peixes nativos, como os análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH_a). Estes compostos são utilizados na pecuária terrestre há muitos anos, e portanto já tem registro no Brasil. Os hormônios sintéticos não desencadeiam resposta imune nos peixes tratados, mas demandam um tempo maior para exercer a resposta fisiológica (Zohar e Mylonas, 2001) e, em algumas espécies, devem ser administrados juntamente com bloqueadores de dopamina para terem efeito (Rottmann, Shireman e Chapman, 1991).

2.2.2. Gonadotrofina coriônica humana (HCG)

A gonadotrofina coriônica humana (HCG), amplamente utilizada em bovinos e equinos, foi testada em espécies nativas brasileiras (*Colossoma macropomum*, Chellapa *et al.*, 1999; *Brycon insignis*, Andrade-Talmelli *et al.*, 2002; *Pseudoplatystoma fasciatum*, Leonardo *et al.*, 2003; *Steindachneridion parahybae*, Caneppele *et al.*, 2009). É um produto sintético e de fácil aquisição, contendo concentração de LH padronizada para a indução reprodutiva, porém, como desvantagens, pode desencadear reação imune, e devido a grande diferença na estrutura molecular comparada à Gth de peixes, demanda doses elevadas para estimulação nas espécies (Harvey e Carolsfeld, 1993).

2.2.3. Análogos de GnRH

O GnRH é um decapeptídeo descoberto pela primeira vez no cérebro de mamíferos, e originalmente denominado Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante (LHRH), devido à sua atividade liberadora de LH (Matsuo *et al.*, 1971). Posteriormente, foi renomeado como

GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas) após demonstração de sua ação estimuladora de secreção de FSH e LH. Desde a caracterização do primeiro GnRH, outras formas de GnRH foram isoladas e caracterizadas do cérebro de outras espécies e, até o momento, são conhecidas 24 formas diferentes de GnRH (Kah *et al.*, 2007). Algumas espécies de teleósteos expressam três GnRH no cérebro (Kah *et al.*, 2007).

Devido a múltiplas variantes do GnRH e a presença simultânea de vários GnRHs no cérebro, estudos foram conduzidos não só sobre suas funções biológicas específicas, mas também para o desenvolvimento de drogas derivadas de GnRH específicas para aplicações terapêuticas. Como foi observado que todas as formas de GnRH estimulam a secreção de LH, pesquisas foram direcionadas ao desenvolvimento de agonistas do GnRH (GnRHa), nos quais modificações na estrutura do GnRH podem levar a um aumento da bioatividade em comparação à forma natural. Três regiões altamente conservadas da estrutura do decapeptídeo, o NH₂-terminal (pGlu-His-Trp-Ser), o COOH-terminal (Pro-GlyNH₂) e o aminoácido na posição seis, são indicativos da importância destas sequências na bioatividade da molécula, no que diz respeito à resistência enzimática, ligação ao receptor e ativação. Com base nas atividades biológicas específicas destas regiões, milhares de GnRHas e antagonistas foram desenvolvidos para aplicações terapêuticas no controle de distúrbios reprodutivos (revisado em Mañanós, Duncan e Mylonas, 2008; Padula, 2005).

Os análogos de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa) estimulam a secreção de estoques de Lh endógenos pela hipófise, aumentando a concentração plasmática de Lh (Levavi-Sivan *et al.*, 2004; Mylonas e Zohar, 2001). Em teleósteos, o Lh endógeno, por sua vez, atua a nível gonadal provocando um pico de 17 α , 20 β -Di-hidroxi-4-pregnen-3-ona (17 α , 20 β -DHP) chamada de substância indutora da maturação (MIS) que promove a quebra da vesícula germinativa e a ovulação em fêmeas (Lubzens *et al.*, 2010; Nagahama e Yamashita, 2008; Ogiwara e Takahashi, 2017). Nos machos, o Lh promove a esteroidogênese e o processo de espermição (Mylonas, Fostier e Zanuy, 2010).

Os GnRHas são incapazes de desencadear resposta imune, mas apresentam como desvantagem o tempo mais prolongado de resposta dos peixes uma vez que atuam em nível mais elevado do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas quando comparados ao extrato hipofisário (Zohar e Mylonas, 2001). Ainda, em algumas espécies de peixes que têm forte ação inibitória da dopamina na secreção de gonadotrofinas, os GnRHas devem ser administrados juntamente com drogas antidopaminérgicas (Rottmann, Shireman e Chapman, 1991). O GnRHa

proporciona uma estimulação mais equilibrada dos eventos reprodutivos pela melhor integração desses com outras funções fisiológicas, afetando direta ou indiretamente a liberação endógena de outros hormônios necessários para uma maturação final e desova bem sucedida (Zohar e Mylonas, 2001).

Existe uma grande variedade de hormônios superativos de análogos GnRH que vêm sendo utilizados nas últimas décadas na aquicultura para indução à desova de peixes. A seguir, são destacados alguns disponíveis comercialmente:

2.2.4. Acetato de buserelina

O Acetato de Buserelina [D-Ser⁶, Pro⁹ Net], presente nos compostos comerciais Conceptal[®], Gonaxal[®] e Sincroforte[®], é um análogo sintético nonapeptídico do GnRH muito utilizado em protocolos de sincronização de cio de vacas, éguas e coelhas, e com indicação para peixes em seu bulário (Conceptal[®]). A buserelina foi testada em pacu *Piaractus mesopotamicus* (Carolsfeld *et al.*, 1988) e mais tarde em outros peixes nativos brasileiros como *Leporinus macrocephalus* (Pereira *et al.*, 2017), *Astyanax fasciatus* (Andrade *et al.*, 2014) e *Prochilodus lineatus*, *Brycon orbygnianus* e *Piaractus mesopotamicus* (Paulino *et al.*, 2011).

2.2.5. Gonadorelina

A gonadorelina é o equivalente sintético do GnRH natural [D-Ala⁶, Pro⁹ NEt]. Frequentemente utilizado em mamíferos, nos produtos Fertagyl[®], Gonavet[®], Dorelin[®] e Profertil[®], dentre outros, a gonadorelina foi testada em *Prochilodus lineatus* (Andrade *et al.*, 2014), *Astyanax bimaculatus* (Felizardo *et al.*, 2012) e *Colossoma macropomum* (Muniz, Catanho e Santos, 2008).

É importante destacar que diferentes formulações de GnRH podem produzir resultados diferentes em uma dada espécie, dado as diferenças em suas estruturas moleculares. Daí a importância de se testar mais de um composto sintético e verificar a eficácia de todos. A gonadorelina é a forma sintética equivalente ao GnRH-1 e, assim como o hormônio endógeno, é formada por uma cadeia de 10 aminoácidos (Chenault *et al.*, 1990). A buserelina tem uma D-serina na posição 6 e uma etilamida na posição 10 (Picard-Hagen *et al.*, 2015). Essa mudança específica na formação dos aminoácidos confere maior potência ao acetato de buserelina.

Levavi-Sivan *et al.* (2004) mostraram que uma injeção de mGnRH α é mais potente que sGnRH α no estímulo de desova de *Bidyanus bidyanus*, levando a um aumento mais duradouro no Lh plasmático porém com fertilidade reduzida. Assim, a origem do GnRH, as dosagens e número de aplicações podem produzir efeitos diversos nas espécies testadas.

2.2.6. Método “Linpe”

Existem ainda preparações hormonais para uso exclusivo em peixes que combinam um análogo de GnRH de salmão [D-Arg⁶, Pro⁹ Net] ou de mamífero [D-Ala⁶, Pro⁹ Net] e um antagonista de dopamina (domperidona, metoclopramida, pimizida), cujos nomes comerciais são Ovaprim[®], Ovopel[®], Aquaspawn[®], Dagin[®], entre outros. A dopamina (DA) atua como um inibidor endógeno de liberação de gonadotrofinas e a injeção de um antagonista do receptor de dopamina potencializa o efeito do GnRH sobre a ovulação (Peter e Yu, 1997). Este tratamento combinado é conhecido como "Método Linpe" em homenagem aos pesquisadores Lin e Peter, que desenvolveram a técnica (Peter, Lin e Van Der Kraak, 1988).

Em peixes, os antagonistas da dopamina têm um impacto significativo no processo de maturação dos oócitos e a ovulação definitiva através de uma via indireta, isto é, a secreção de Lh da hipófise por GnRH α (Dufour *et al.*, 2010). A domperidona é antagonista do receptor de dopamina mais potente até o momento, e portanto, tem muito êxito na indução de espécies de peixes que apresentam alta influência da dopamina em sua fisiologia reprodutiva (Lin e Peter, 1996).

2.2.7. Implantes de GnRH

Outra forma de aplicação de GnRH exógeno é com implante de análogo de GnRH em matriz de colesterol, com objetivo principal de liberar lentamente o hormônio a fim de estimular a maturação ovariana (Mylonas e Zohar, 2001), para sincronizar e/ou antecipar o período de desova em algumas espécies.

Em peixes neotropicais, implantes de liberação lenta de GnRH α foram aplicados em fêmeas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Ovaplant[®]; Kuradomi, Foresti e Batlouni, 2017). Embora houvesse um aumento na frequência de fêmeas aptas à desova no período reprodutivo, elas ainda assim precisariam ser submetidas à indução hormonal para alcançarem a desova. Em *Brycon siebenthalae*, o implante de GnRH α mostrou-se ineficiente em induzir fêmeas à desova

(Pardo-Carrasco *et al.*, 2002). Esses resultados reforçam a ideia de que os sistemas de liberação lenta de GnRH α costumam ser eficazes e alcançam máxima fecundidade principalmente em espécies assíncronas (Mylonas, Fostier e Zanuy, 2010).

2.2.8. Pesquisas sobre hormônios sintéticos

Nas últimas décadas, diferentes pesquisas abordaram os efeitos dos hormônios sintéticos na maturação final e desova de peixes neotropicais, para substituir a hipófise de carpa (Tabela 1). Isto se explica pelo fato dos estudos envolvendo a indução reprodutiva de peixes serem espécie-específicos e portanto cada espécie deve ser particularmente estudada, bem como o efeito de cada composto. Mundialmente, existe um crescente interesse em controlar com bastante precisão a desova em criadouros comerciais, maximizando o rendimento e minimizando o custo de produção e esforço envolvido com produção de larvas, sendo os produtos sintéticos relativamente mais econômicos e práticos.

Tabela 1 – Trabalhos sobre o uso de hormônios sintéticos na indução à maturação e ovulação de peixes neotropicais

Espécie	Tratamento hormonal	♀ desovadas/tratadas	TF%	TE%	Referência
<i>Brycon cephalus</i>	Buserelina	0/3			Ramos <i>et al.</i> , 1997
	EHC	2/3	80	80	
	Gonadorelina	0/3			
	EHC	3/3	70	50	
<i>Brycon henni</i>	Ovaprim	4/4	86	-	Lenis, Restrepo e Cruz Casallas, 2009
	Ovopel	4/4	80		
	EHC	3/4	0	-	
<i>Brycon orbygnianus</i>	Buserelina	-/10	0	-	Paulino <i>et al.</i> , 2011
<i>Colossoma macropomum</i>	Ovaprim	2/3	11	19,7	Acuña e Rangel, 2009
	EHC	3/3	63	68	
	Ovopel	5/8	51	62	Souza <i>et al.</i> , 2018
<i>Leporinus elongatus</i>	Buserelina + Met	4/5	24	1,3	Pereira <i>et al.</i> , 2018
	Buserelina + Met	5/5	1,4	0,4	
	EHC	5/5	0	-	
<i>Leporinus macrocephalus</i>	Buserelina + Met	9/9	6,2	0	Pereira, <i>et al.</i> , 2017

	EHC	7/10	63	60	
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Buserelina	-/10	-	-	Paulino <i>et al.</i> 2011
<i>Prochilodus lineatus</i>	Ovaprim	4/4	48	39	Viveiros <i>et al.</i> , 2013
	Ovaprim	6/6	52	48	
	EHC	4/4	46	39	
	Buserelina	-/10	40	-	Paulino <i>et al.</i> , 2011
	Gonadorelina	4/10	83	-	Andrade <i>et al.</i> , 2014
	Buserelina	2/10	0	-	
	EHC	2/10	93,5	-	
<i>P. magdalenae</i>	Ovaprim	5/12	82	59	Cordero C., Pertuz B. e Solano, 2003
	EHC	11/12	89	63	
<i>Rhamdia quelen</i>	HCG	1/4	40	-	Carneiro e Mikos, 2008
	HCG	2/4	36	-	
	HCG	2/8	80	-	
	Ovopel	0/8			

EHC	10/12	81	-	
Ovaprim	7/8	87	82	Ittzés <i>et al.</i> , 2014

TF-Taxa de fertilização; TE-Taxa de eclosão; Met-metoclopramida; EHC-extrato hipofisário de carpa; HCG-gonadotrofina coriônica humana; - não informado pelos autores

3. O Tambaqui

O tambaqui *Colossoma macropomum* é um caracídeo nativo da região amazônica e principal representante nativo da piscicultura no Brasil, devido a sua característica de sabor, rusticidade, rápido crescimento e boa conversão alimentar. Com destacada importância socioeconômica, sua produção em 2018 foi de 100,5 mil toneladas e valor de R\$ 782,5 milhões, representando 13% da produção total de peixes sob cultivo (IBGE, 2020). A produção comercial de tambaqui concentra-se nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil, principalmente nos estados de Roraima e Amazonas (Valenti *et al.*, 2021).

O tambaqui é uma espécie reofílica de desova total sincrônica e sem cuidado parental (Vazzoler, 1996). Em seu habitat, a primeira maturação de tambaqui ocorre aos cinco anos, com 60 cm de comprimento furcal (Villacorta-Correa e Saint-Paul, 1999).

Em condições favoráveis de cultivo intensivo, a puberdade em machos de tambaqui inicia-se aos cinco meses de idade (34 cm de comprimento total e aproximadamente 750 g de peso total). Apesar da falta de estudos caracterizando a foliculogênese completa (até ovulação), Almeida *et al.* (2016) afirmam que em cultivo intensivo, a foliculogênese não se inicia antes das fêmeas atingirem 1200 g de peso corporal.

Em plantéis, matrizes de tambaqui podem desovar pelo menos duas vezes por ciclo através de induções hormonais utilizando o extrato bruto de hipófise de carpa (Pires *et al.*, 2018). As fêmeas podem eliminar uma massa de ovos correspondente a aproximadamente 13% do seu peso vivo, índice que aumenta com o peso das fêmeas (Santos, Ferreira e Zuanon, 2009), e cada grama de ovos contém até 1500 oócitos (Leite *et al.*, 2013).

A produção de formas jovens de tambaqui é realizada eficazmente com o uso de extrato bruto de hipófise de carpa desde a década de 70 (Zaniboni Filho e Barbosa, 1996). No entanto,

estudos com outros hormônios já foram conduzidos. Chellappa *et al.* (1996) testaram a gonadotropina coriônica humana (hcg, 30 IU/g) em fêmeas e 20% apresentaram ovulação completa, com 50% de fertilização e 60% de eclosão larval. Acuña e Rangel (2009) testaram o Ovaprim® (GnRH_a de salmão + domperidona, antagonista de dopamina) em fêmeas de tambaqui, concluindo que o produto, na dose recomendada pelo fabricante, afetou a qualidade dos oócitos, refletindo em baixas taxas de fertilização (20%) e eclosão (11%). O Ovopel® (GnRH_a de mamífero + metoclopramida, antagonista de dopamina) também foi testado na reprodução induzida de tambaqui com taxa de fertilização de 50 a 62% e de eclosão de 33 a 57% (Souza *et al.*, 2018).

O uso de hipófise de carpa na reprodução assistida de tambaqui, apesar da sua alta eficácia, representa um risco na sua produção. Com o crescente aumento e profissionalização da piscicultura no país, muito em breve o uso deste produto será restrito e outros compostos que possam sustentar a cadeia de produção comercial do tambaqui e outros peixes nativos devem ser disponibilizados. Os produtos sintéticos representam hoje a principal alternativa e são mais competitivos em termos de qualidade e custo comparados aos extratos hipofisários. Assim, é urgente a necessidade de busca e identificação de produto(s) que de uma forma segura e padronizada induza(m) a maturação final das fêmeas e a espermiacção de machos de tambaqui com eficiência.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA, J. J. A.; RANGEL, J. L. H. Effects of hypophysial extract of common carp and the analog of the GnRH on the final maturation oocyte and the spawning of cachama negra (*Colossoma macropomum*). **Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia**, 2009.
- AIZEN, J.; HOLLANDER-COHEN, L.; SHPILMAN, M.; LEVAVI-SIVAN, B. Biologically active recombinant carp LH as a spawning-inducing agent for carp. **Journal of Endocrinology**, v. 232, n. 3, p. 391–402, 2017.
- ALMEIDA, F. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 174–180, 2013.
- ALMEIDA, F. L.; LOPES, J. S.; CRESCENCIO, R.; IZEL, A. C. U.; CHAGAS, E. C.; BOIJINK, C. Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight. **Aquaculture**, v. 452, p. 224–232, 2016.
- ANDRADE, E. S.; CARVALHO, A. F. S.; FERREIRA, M. R.; PAULA, F. G.; RODRIGUES, F. S.; FELIZARDO, V. O.; REIS NETO, R. V.; MURGAS, L. D. S. Indutores hormonais na reprodução artificial de curimba (*Prochilodus lineatus*). **Revista Brasileira de Reprodução**

Animal, v. 38, n. 4, p. 230–236, 2014.

MUNIZ, J. A. S. M.; CATANHO, M. T. J.A.; SANTOS, A.J.G. Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paul, 34 (2): 205 – 211. 2008.

BAYLIS, J. R. Paternal behaviour in fishes: a question of investment, timing or rate? **Nature**, v. 276, n. 5689, p. 738, 1978.

BOUTIER, M.; RONSMANS, M.; RAKUS, K., JAZOWIECKA-RAKUS, J., VANCOSK C., MORVAN, L, PEÑARANDA, M.M; STONE DM, WAY K, VAN BEURDEN SJ, DAVISON, A.J; VANDERPLASSCHEN, A. Cyprinid Herpesvirus 3: An Archetype of Fish Alloherpesviruses. **Advances in Virus Research**. v.93,161-256. 2015.

CALIXTO, E. S.; SANTOS, D. F. B.; LANGE, D.; GALDIANO, M. S.; RAHMAN, I. U. Journal of Environmental Aquaculture in Brazil and worldwide : overview and perspectives. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 01, p. 98–107, 2020.

CAROLSFELD, J.; RAMOS, S. M.; ORMANEZI, R.; GOMES, J. H.; BARBOSA, J. M.; HARVEY, B. Analysis of protocols for application of an LHRH analog for induced final maturation and ovulation of female pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887). **Aquaculture**, v. 74, n. 1–2, p. 49–55, nov. 1988.

CHELLAPPA, S.; CACHO, M. S. R. F.; HUNTINGFORD, F. A.; BEVERIDGE, M. C. M. Observations on induced breeding of the Amazonian fish tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier) using CPE and HCG treatments. **Aquaculture Research**, v. 27, n. 2, p. 91–94, 1996.

CHENAULT, J. R.; KRATZER, D. D.; RZEPKOWSKI, R. A.; GOODWIN, M. C. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. **Theriogenology**, 1990.

CORDERO C., A.; PERTUZ B., V.; SOLANO, J. Reproducción inducida del bocachico (*Prochilodus magdalenae*, Steindachner, 1878) con ovaprim®. **Revista MVZ Córdoba**, n. 2, p. 2003, 2003.

DAVIDOVICH, M.; DISHON, A.; ILOUZE, M.; KOTLER, M. Susceptibility of cyprinid cultured cells to cyprinid herpesvirus 3. **Archives of Virology**, v. 152, n. 8, p. 1541–1546, 2007.

DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. A. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. **Fish Physiology**, v. 9, p. 351–403, 1983.

DUBOIS, E. A.; ZANDBERGEN, M. A.; PEUTE, J.; GOOS, H. J. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. **Brain Research Bulletin**, v. 57, n. 3–4, p. 413–418, 2002.

DUFOUR, S.; SEBERT, M. E.; WELTZIEN, F. A.; ROUSSEAU, K.; PASQUALINI, C. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 1, p. 129–160, 2010.

FELIZARDO, V. O.; MURGAS, L. D. S.; ANDRADE, E. S.; LÓPEZ, P. A.; FREITAS, R. T.

F.; FERREIRA, M. R. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1570–1574, 2012.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION. **De La Pesca Y La Acuicultura**. [s.l: s.n.]. v. 3

IBGE. Indicadores IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (Março/2019). **Ibge**, p. 89, 2020.

IHERING, R. VON. A method for inducing fish to spawn. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 4, n. 34, p. 15–16, 1937.

KAH, O.; LETHIMONIER, C.; SOMOZA, G.; GUILGUR, L. G.; VAILLANT, C.; LAREYRE, J. J. **GnRH and GnRH receptors in metazoa: A historical, comparative, and evolutive perspective** *General and Comparative Endocrinology*, 2007.

KURADOMI, R. Y.; FORESTI, F.; BATLOUNI, S. R. The effects of sGnRH α implants on *Piaractus mesopotamicus* female breeders. An approach addressed to aquaculture. **Aquaculture International**, v. 25, n. 6, p. 2259–2273, 2017.

LEITE, L. V.; MELO, M. A. P.; OLIVEIRA, F. C. E.; PINHEIRO, J. P. S.; CAMPELLO, C. C.; NUNES, J. F.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 421–429, abr. 2013.

LENIS, G.; RESTREPO, L.; CRUZ CASALLAS, P. Evaluación de tres protocolos de tratamiento hormonal sobre el diámetro de ovocitos de sabaleta *Brycon henni*. **Rev. colomb. cienc. pecu.**, v. 8, n. 65, p. 131–142, 2009.

LEVAVI-SIVAN, B.; VAIMAN, R.; SACHS, O.; TZCHORI, I. Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 229, n. 1–4, p. 419–431, 2004.

LIN HR; PETER RE. Hormones and spawning in fish. **Asian Fisheries Science** v.9, 21–33. 1996.

LISTER, A. L.; KRAAK, G. VAN DER. An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 159, n. 1, p. 46–57, 2008.

LUBZENS, E.; YOUNG, G.; BOBE, J.; CERDÀ, J. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 367–389, 2010.

MAÑANÓS, E.; DUNCAN, N.; MYLONAS, C. Reproduction and Control of Ovulation, Spermiation and Spawning in Cultured Fish. *In: Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. (Cabrita E., Robles V., Herráez M.P., Eds., ISBN 978-0-8493-8053-2), pp.3-80. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. 2008.

MATSUO, H.; BABA, Y.; NAIR, R. M. G.; ARIMURA, A.; SCHALLY, A. V. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 43, n. 6, 1971.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 516–534, fev. 2010.

MYLONAS, C. C.; ZOHAR, Y. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. **Aquaculture**, v. 202, n. 3, p. 205–220, 2001.

NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA, M. Regulation of oocyte maturation in fish. **Development Growth and Differentiation**, v. 50, n. SUPPL. 1, 2008.

OGIWARA, K.; TAKAHASHI, T. Involvement of the nuclear progesterin receptor in LH-induced expression of membrane type 2-matrix metalloproteinase required for follicle rupture during ovulation in the medaka, *Oryzias latipes*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 450, 2017.

OHTA, T.; MIYAKE, H.; MIURA, C.; KAMEI, H.; AIDA, K.; MIURA, T. Follicle-Stimulating Hormone Induces Spermatogenesis Mediated by Androgen Production in Japanese Eel, *Anguilla japonica*. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 6, p. 970–977, 2007.

PADULA, A. M. GnRH analogues—agonists and antagonists. **Animal Reproduction Science**, v. 88, n. 1–2, p. 115–126, ago. 2005.

PARDO-CARRASCO, S.; SUAREZ-MAHECHA, H.; MUÑOZ-LARA, D.; ARIAS CASTELLANOS, J.; GIL, H. Inducción de la ovulación y del desove del yamú, *Brycon siebenthalae*, con implantes de mGnRH-a. **Boletim do Instituto de Pesca**, 2002.

PAULINO, M. S.; MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; LIMA, F. S. M. DE; FELIZARDO, V. DE O. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de buserelina. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 1, p. 39–45, 2011.

PEIXE BR. **Anuário Peixe BR - Associação Brasileira da Piscicultura**, p. 140, 2021.

PEREIRA, T. S. B.; BOSCOLO, C. N. P.; MOREIRA, R. G.; BATLOUNI, S. R. The use of mGnRH_a provokes ovulation but not viable embryos in *Leporinus macrocephalus*. **Aquaculture International**, v. 25, n. 2, p. 515–529, 2017.

PEREIRA, T. S. B.; BOSCOLO, C. N. P.; MOREIRA, R. G.; BATLOUNI, S. R. *Leporinus elongatus* induced spawning using carp pituitary extract or mammalian GnRH analogue combined with dopamine receptor antagonists. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 1, p. 64–70, 2018.

PETER, R. E.; LIN, H. R.; KRAAK, G. VAN DER. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: Advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. **Aquaculture**, 1988.

PETER, R. E.; YU, K. L. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: Basic and applied aspects. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 7, n. 2, p. 173–197, 1997.

PICARD-HAGEN, N.; LHERMIE, G.; FLORENTIN, S.; MERLE, D.; FREIN, P.;

GAYRARD, V. Effect of gonadorelin, lecorelin, and busserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. **Theriogenology**, 2015.

PIRES, L. B.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; SANCHES, E. A.; ROMAGOSA, E.; SILVA, T. G. DA; RECH, S.; STREIT, D. P.; POVH, J. A. *Colossoma macropomum* females can reproduce more than once in the same reproductive period. **Animal Reproduction Science**, v. 196, n. June, p. 138–142, set. 2018.

ROTTMANN, R. W.; SHIREMAN, J. V; CHAPMAN, F. A. Hormonal Control of Reproduction in Fish for Induced Spawning. **Southern Regional Aquaculture Center Publication**, v. 424, n. 424, p. 1–4, 1991.

Peixes comerciais de Manaus. In: Geraldo (Ed.). – Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, 2006. p.144

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. **Peixes comerciais de Manaus**. 2. ed. Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, 2006. 144 p

SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 43–56, 2002.

SOUZA, F. N.; FATIMA FERREIRA MARTINS, E. DE; CORRÊA FILHO, R. A. C.; ABREU, J. S. DE; PIRES, L. B.; STREIT, D. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; POVH, J. A. Ovopel® and carp pituitary extract for induction of reproduction in *Colossoma macropomum* females. **Animal Reproduction Science**, v. 195, p. 53–57, 1 ago. 2018.

VALENTI, W. C.; BARROS, H. P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G. W.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, n. July 2020, p. 100611, 2021.

VAZZOLER, A. E. A. de M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM; São Paulo: 1996. SBI. 169 p.

VILLACORTA-CORREA, M. A.; SAINT-PAUL, U. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) in central Amazon, Brazil. **Revista brasileira de biologia**, v. 59, n. 4, p. 637–652, 1999.

VIVEIROS, A. T. M.; GONÇALVES, A. C. S.; CHIACCHIO, I. M. DI; NASCIMENTO, A. F.; ROMAGOSA, E.; LEAL, M. C. Gamete quality of streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) after GnRHa and dopamine antagonist treatment. **Zygote**, v. 23, n. 2, p. 212–221, 2013.

XIMENES, L. F. Produção De Pescado No Brasil E No Nordeste Brasileiro. **Caderno Setorial - Escritório de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE**, v. 150, n. Ano 5, p. 1–16, 2021.

ZANIBONI-FILHO, E.; BARBOSA, N.D.C. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia**, 56, 655-659. 1996.

ZOHAR, Y.; MUÑOZ-CUETO, J. A.; ELIZUR, A.; KAH, O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 438–455, 2010.

ZOHAR, Y.; MYLONAS, C. C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. **Aquaculture**, v. 197, n. 1, p. 99–136, 2001.

CAPÍTULO II

Effects of GnRH analogues on strip spawning and steroid levels of *Colossoma macropomum*

Submetido à Revista *Aquaculture*

Effects of GnRH analogues on strip spawning and steroid plasma levels of *Colossoma macropomum*

Rosilane Gomes de Souza de Oliveira¹ (<https://orcid.org/0000-0002-8777-1662>), Gabriela Brambila de Souza² (<https://orcid.org/0000-0002-6385-5239>), Alexandre Nizio Maria³ (<https://orcid.org/0000-0003-0259-1257>), Ronã Alves de Freitas⁴; (<https://orcid.org/0000-0002-9532-1944>), Fernanda Loureiro de Almeida^{2*} (<https://orcid.org/0000-0003-3507-2808>)

¹Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Manaus, Amazonas, Brazil.

²Embrapa Amazônia Ocidental, CPAA, Manaus, Amazonas, Brazil.

³Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe, Brazil.

⁴Secretaria Executiva de Pesca e Aquicultura (SEPA), Manaus, Amazonas, Brazil.

*Correspondence: Fernanda Loureiro de Almeida, fernanda.almeida@embrapa.br, Rodovia AM-010, Km 29, Caixa Postal 319, CEP 69010-970.

Abstract

The tambaqui *Colossoma macropomum* is the main species for the Brazilian native aquaculture and neighboring countries, but the production of fries is still based on carp pituitary extract (CPE), implying risk of disease outbreaks. We tested three commercially available GnRH analogues (GnRHa) and compared the results with CPE induction. We used 28 females on the following treatments: T1- salmon GnRHa - 5.0 µg/kg combined with domperidone - 2.5 mg/kg; T2- gonadorelin - 60 µg/kg; T3- buserelin acetate - 0.7 µg/kg, and T4 - CPE - 5.5 mg/kg. We analyzed parameters of spawning success under stripping, and egg quantity and quality. Plasma concentration of 17β-estradiol, 17α- hydroxyprogesterone and 17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one was assessed before treatment and after stripping. All CPE-treated females released eggs via stripping, as well as 86% treated with sGnRHa, 86% with gonadorelin, and 57% with buserelin. Degree-hour (DH) for strip spawning was higher in the GnRHa groups than CPE ($p \leq 0.001$). Eggs total mass, number of eggs/g of ova, relative fecundity, fertilization index and the embryo survival at 348 DH post fertilization were similar in all groups. There was a significant increase in steroids levels in all groups, including the fish that didn't release eggs under stripping. Although the commercial GnRHa didn't stimulate the final maturation and/or ovulation in all females, they induced the ovulation of eggs of equal quality and quantity of the CPE, indicate a great potential of such drugs in the artificial reproduction of the species, with the advantage of being from a singular injection.

Keywords: buserelin, fish farming, gonadorelin, sGnRHa, steroids.

1. Introduction

In vertebrates, reproduction is mastered by different hormones along the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and culminates in the production of gametes, steroid hormones and reproductive behavior. In a conserved manner among different classes, the hypothalamus processes and integrates external (photoperiod, temperature, rainfall, social interactions, etc.) and internal (mainly body condition and energy balance) information and regulates the synthesis and release of gonadotropic glycoproteins by the pituitary gland, via the neuropeptide gonadotropin releasing hormone (GnRH; Peter and Yu, 1997). The gonadotropins, Fsh (follicle stimulating hormone) and Lh (luteinizing hormone) act on the gonads stimulating their exocrine (production of fertile gametes) and endocrine (sex steroid production) activities. In females, while the Fsh stimulates the follicle cells to produce and release 17β -estradiol (E_2), whose main function is during early vitellogenesis, the Lh stimulates the secretion of progestins (17α -hydroxyprogesterone - 17α OHP, 17α 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one - 17α 20 β P and/or 17α 20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one - 20 β S), which are responsible for the final steps of oocyte maturation and ovulation (reviewed by Levavi-Sivan et al., 2010).

In some species of fish, the lack of crucial environmental stimuli results in neuroendocrine failures preventing gonad maturation to complete. In such a case, individuals reach gonad maturation, but females do not complete meiosis, final oocyte maturation, ovulation and/or spawning and males discharge little or no semen as a result of a decreased Lh release (Lin and Peter, 1996; Lubzens et al., 2010; Mañanós, 2002; Mylonas and Zohar, 2001). To overcome this failure, the reproduction of some cultivated fish is achieved via administration of exogenous hormones (Zohar et al., 2010), which can act at different levels of the axis. The most common therapy for fish reproduction is the use of GnRH analogues (GnRH α), which mimics the brain-derived stimulation for the pituitary gland to produce endogenous Lh (Nyuji et al., 2019) allowing final maturation. Another therapy is based on exogenous gonadotropins,

present in pituitary explants of mature fish and in human chorionic gonadotropin (hCG), which act directly on the individuals' ovaries and testes. Independent on the type of action, any hormonal therapy aiming at fish final maturation, ovulation and spawning also integrates with the endogenous endocrine system and have effects on the sex steroid production.

The tambaqui *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1816) is a total spawner Amazonian species that migrates large distances upstream during the annual breeding season, which occurs between September and February in their native environment (Villacorta-Correa and Saint-Paul, 1999). As a rheophilic species that requires the environmental stimuli to mature and spawn, the tambaqui in captivity only reaches ovulation under exogenous stimuli and spawns via stripping (Zaniboni Filho and Barbosa, 1996). In spite of being the main native species in the Brazilian aquaculture, tambaqui fingerling production has been based on the use of crude carp pituitary extract (CPE) since the domestication of the species (Woynarovich, 1986). However, like any crude biological product, CPE has alarming disadvantages: it represents a risk of disease transmission and the accurate identity and amount of their bioactive compounds varies greatly intraspecies and interspecies (Donaldson and Hunter, 1983). For these reasons, some Brazilian states have restricted the use of pituitary extracts exclusively to scientific research, in compliance with Normative Instruction No. 53, article 4 of the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply.

The synthetic analogues of GnRH are simple, stable and standardized peptides that are active in low concentrations (Harvey and Carosfeld, 1993). There are several registered and commercially available GnRHs. Among them, the gonadorelin (D-Ala⁶-Pro⁹-Net, mGnRH) is the short-acting synthetic form (similar to the natural GnRH) and the buserelin acetate ([D-Ser (But)⁶-Pro⁹-NEt], mGnRH) is the short-acting agonist analogue (Romagnoli et al., 2009). The buserelin acetate is 40 to 200 times more potent than the gonadorelin (Chenault et al., 1990). Both are widely used in mammals and have been tested in fish species with differing results

(Fakriadis et al., 2020; Fernandez-Palacios et al., 2014; Ibarra-Castro and Duncan, 2007; Ngamvongchon et al., 1988). Specifically in South American seasonal species, gonadorelin and buserelin have been largely studied for the last decade to eventually support the industry (Andrade et al., 2014; Carolsfeld et al., 1988; Felizardo et al., 2012; Pereira et al., 2018, 2017).

Aiming at fish farming, a synthetic peptide analogue of salmon gonadotropin-releasing hormone (sGnRHa) is available in different concentrations and delivering systems (Mylonas et al., 2010). The sGnRHa may or may not be combined with dopamine inhibitors, since dopamine down regulates GnRH receptors synthesis and activity (Dufour et al., 2010; Levavi-Sivan et al., 2004), therefore blocking the pro-spawning GnRH function.

Considering the lack of consistent information on the influence of GnRHa therapy on the strip spawning, this study aimed to test three commercially available GnRHa peptides in mature females and assessed their effects on i) the capacity to induce strip-spawning, ii) the quality and quantity of spawned eggs and iii) the plasma levels of E2, 17 α OHP and 17 α 20 β P.

2. Material and methods

The authors assert that all procedures of this work comply with the Ethical Principles of Animal Experimentation, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) – Embrapa Amazônia Ocidental (n° 05/2018, SEI 21158.003669/2018-77). The project has Authorization of Access to Genetic Heritage under register A5784B5.

2.1. Experiment location, management and selection of animals

The experiment was carried out at the Center of Aquaculture Technology, Training and Production of Balbina – CTTPA – Amazonas, Brazil (1 ° 55'10.01" S; 59 ° 27'54.67" W), from October 2019 to February 2020. Fish were reared in 2000 m² earthen ponds, in a stocking

density of 23 kg/100m² (approximately 4 fish/100m²). The ratio of males and females was 1:1. Fish were fed commercial fish feed (28% crude protein) every other day (at 1.5% of biomass), twice a day until apparent satiety. Fish were not fed on the days of the experiment.

A total of 74 six-year-old tambaqui (28 females and 46 males; identified by tags) were selected based on the apparent maturation status of their gonads as follows. All chosen males released semen under slight abdominal pressure. The females presenting a soft and bulging abdomen and hyperemic genital pore (Woynárovich and Van Anrooy, 2019) were cannulated and few eggs were immersed in Serra's solution for evaluation of the germinal vesicle's position (Stoeckel, 2000). All females selected for the study presented eggs with eccentric germinal vesicles. The fish were transported to 6,000 L ceramic tanks (treatment tanks, one for the males and one for the females) with constant water renewal (24 L/min; dissolved oxygen: 6.08 ± 0.07 mg/L), for further treatment.

Body weight (BW) and total length (TL) were recorded and the relative condition factor (Kn) was calculated individually, by the quotation of BW and expected weight (EW) for a given size (Kn= BW/EW; Le Cren, 1951; Scott et al., 2006).

2.3. Treatments

Four treatments were tested: T1- 5.0 µg/kg BW of sGnRHa combined with domperidone (Ovaprim®, Syndel Laboratories Ltd., Nanaimo, BC, Canada, *n* = 7) in a single dose; T2 - 60 µg/kg BW of Gonadorelin (Profertil®, Fabiani Saúde Animal, São Paulo, SP Brazil, *n* = 7) in a single dose; T3 - 0.7 µg/kg BW of Buserelin acetate (Sincroforte®, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brazil, *n* = 7) in a single dose and T4 - 5.5 mg/kg BW of carp pituitary extract - CPE (Danúbio Aquacultura Ltda, Blumenau, SC, Brazil, *n* = 7), divided into two doses (0.5 and 5.0 mg/kg BW within 12 hours; Woynárovich and Van Anrooy, 2019). The doses of the

synthetic analogues were based on previous pilot experiments of our group, which considered primarily the higher potency of the buserelin acetate in comparison with gonadorelin. The males received 2.0 mg/kg BW of CPE divided into two doses: 0.5 and 1.5 mg/kg BW within 12 hours (Woynárovich and Van Anrooy, 2019). The injections were at the base of the pectoral fin, in females and males.

The study was performed in seven alternate weeks, over five months during the reproductive season. In each experimental week, four females were randomly used (one for each treatment) and six to nine males. Therefore, each female was considered a replica. With this scheme, all treatments were tested in the same weeks ($n = 7$ females/treatment) along the reproductive season.

2.4. Accumulated thermal units, stripping and fertilization

For stripping, the accumulated thermal units in degree-hour (DH) was calculated by summing the water temperature ($^{\circ}\text{C}$) every hour in the treatment tank, from the hormone injection to stripping. The ideal moment for stripping was identified by the spawning behavior of the species, such as circle swimming and body shivers (Woynárovich and Van Anrooy, 2019).

Shortly before stripping, each fish received a small dose (65 mg/L) of eugenol solution (Lysanda[®], São Paulo, Brazil; Roubach et al., 2005) diluted in 70% ETOH, applied directly on the gills, to reduce stress and excessive movements. The eggs were collected and immediately weighted. For the fertilization of the eggs of each female, a pool of semen from 2 to 3 random males was used, in order to minimize the effect of the males. To prepare the pool, a small drop of each semen sample was mixed with a few drops of water in a histology slide, for the microscopic observation of sperm motility. Only samples with motility were used to compose

the pool. The pool of semen and eggs were mixed dry on the ratio of 1 mL: 100 g and then hydrated with 500 mL of water from the incubator ($29.01 \pm 0.13^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 6.61 \pm 0.11$). The fertilized eggs were distributed in triplicates in cylindrical-conical incubators, on the ratio 1g : 1L. After stripping, all fish returned to the earth pond, and no mortality was recorded.

2.5. Analysis of spawning rate, egg quality and viability

The spawning rate was evaluated as the percentage of stripped females that released eggs in each treatment. Absolute fecundity (total number of eggs released per fish) was calculated by counting the eggs in four samples of 0.5 g per female and extrapolating to the eggs total weight. We also estimated the number of eggs/g spawn of each female. Relative fecundity was calculated by dividing the total number of eggs by fish BW (Woynárovich and Van Anrooy, 2019). Fertilization ratio was estimated at the end of gastrulation (174 DH after fertilization) by the analysis of three samples of ~ 150 eggs/incubator ($n \sim 1350/\text{treatment}$) in a Petri dish under a stereomicroscope. Similarly, the embryo survival (%) was assessed shortly prior to hatching, at approximately 348 DH after fertilization by counting the eggs with larval movement inside (three samples of ~ 100 eggs/incubator, $n \sim 900/\text{treatment}$).

2.6. Analysis of 17β -estradiol, $17\alpha\text{OHP}$ and $17\alpha20\beta\text{P}$ plasma levels

Blood samples were collected from the caudal vein of all females with heparinized syringes, before the hormone treatment and shortly after stripping. For the CPE group, blood sampling was done before the injection of the first dose and after stripping. The samples were centrifuged at 1500g for 5 min; the plasma was collected and kept at -80°C until analysis.

Plasma levels of 17β -estradiol (E_2), 17α -hydroxyprogesterone ($17\alpha\text{OHP}$) and 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha20\beta\text{P}$) were quantified by enzyme-linked immunosorbent

assay – ELISA (IBL International[®], Hamburg, Germany, for E₂ and 17 α -OHP; Cayman Chemical Company[®], Michigan, USA, for 17 α ,20 β P). Absorbance was measured using a microplate reader (Multiskan FC Thermo Scientific[®], Leicestershire, UK). Analyses were carried out following the manufacturer's instructions, and a standard curve was run for each ELISA plate. For the samples collected before treatment, no dilution was needed in any assay. For samples collected after stripping, the following dilutions were used: 1:8 and 1:16 for E₂, 1:4 for 17 α OHP and 1:50 for 17 α 20 β P. The samples were run in duplicates, and the intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) were 5.72 and 4.05% for E₂; 12.56 and 16.21% for 17 α OHP; and 15.61 and 13.55% for 17 α 20 β P, respectively. All CV values were below 20, as recommended by (Sink et al., 2008). The detection limit of the test was 143 pg/mL for E₂, 5.5 pg/mL for 17 α OHP and 9.4 pg/mL for 17 α 20 β P.

2.7. Statistical analysis

All data were checked for normal distribution and homogeneity of variance by the Kolmogorov-Smirnov and Levene's test, respectively. Data are presented as mean \pm SEM. The parameters of spawning quality and the levels of sex steroids before and after treatment were subjected to one-way ANOVA (followed by Holm-Sidak's multiple comparisons test) or Kruskal-Wallis (if not normally distributed). To estimate the power of each treatment in increasing the steroid levels, we also calculated the fold induction in each female (before treatment and shortly after spawning) and analyzed the data by paired T test or Wilcoxon test. The percentage of spawning females in each treatment group was analyzed through the Chi-square test (χ^2). A threshold of $P < 0.05$ was set to infer statistical significance. Statistical analysis was performed using SigmaStat 3.5 (Systat Software, San Jose, CA, USA).

3. Results

3.1. Condition factor, spawning rate and degree hour for strip spawning

The body weight (5.98 ± 0.2 kg, $p = 0.927$), total length (55.54 ± 1.00 cm, $p = 0.873$) and relative condition factor (Kn, 0.978 ± 0.02 , $R^2 = 0.716$, $p = 0.837$) of the females were similar in all groups. The spawning rate was 100% in the CPE-treated group, 86% in the sGnRHa and gonadorelin, and 57% in the buserelin acetate ($p = 0.201$).

In the CPE treatment, the spawning occurred in a lower accumulated thermal unit (231.3 ± 4 DH) than in all other treatments (323.9 ± 3.8 DH; $p \leq 0.001$; Figure 1A). The latency period was 7.9 ± 0.5 h (CPE group) and 11.20 ± 1.0 h (GnRHa groups), at an average temperature of $29.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

3.2. Egg quantity and quality

There was no statistical difference in the following analysis between all the groups. The fish treated with the analogues released from 624.83 ± 66.9 to 786.5 ± 89.9 g of eggs while the CPE treatment discharged 790.29 ± 66.6 g ($p = 0.245$; Figure 1B). Each gram of eggs contained $1,407.89 \pm 39.9$ cells within the GnRHa groups and $1,389.67 \pm 24.8$ cells in the CPE group ($p = 0.743$), corresponding to an absolute fecundity of 8.78 ± 0.8 to $10.8 \pm 1.5 \times 10^5$ eggs/female in the GnRHa groups and $10.9 \pm 0.9 \times 10^5$ eggs in the CPE group ($p = 0.322$; Figure 1C). The relative fecundity was 157.57 ± 13.1 to 165.03 ± 12.6 and 182.78 ± 11.2 eggs/g of fish in the GnRHa and CPE groups, respectively ($p = 0.508$, Figure 1D).

The fertilization rate varied from 50.39 ± 10.7 to $67.49 \pm 7.8\%$ in the GnRHa groups and $76.95 \pm 1.6\%$ in the CPE group ($p = 0.136$; Figure 1E). Likewise, the embryo survival was

similar in all groups: 52.48 ± 8.5 to $83.97 \pm 5\%$ in the GnRHAs and $73.17 \pm 3.98\%$ ($p = 0.134$, Figure 1F) in the CPE group.

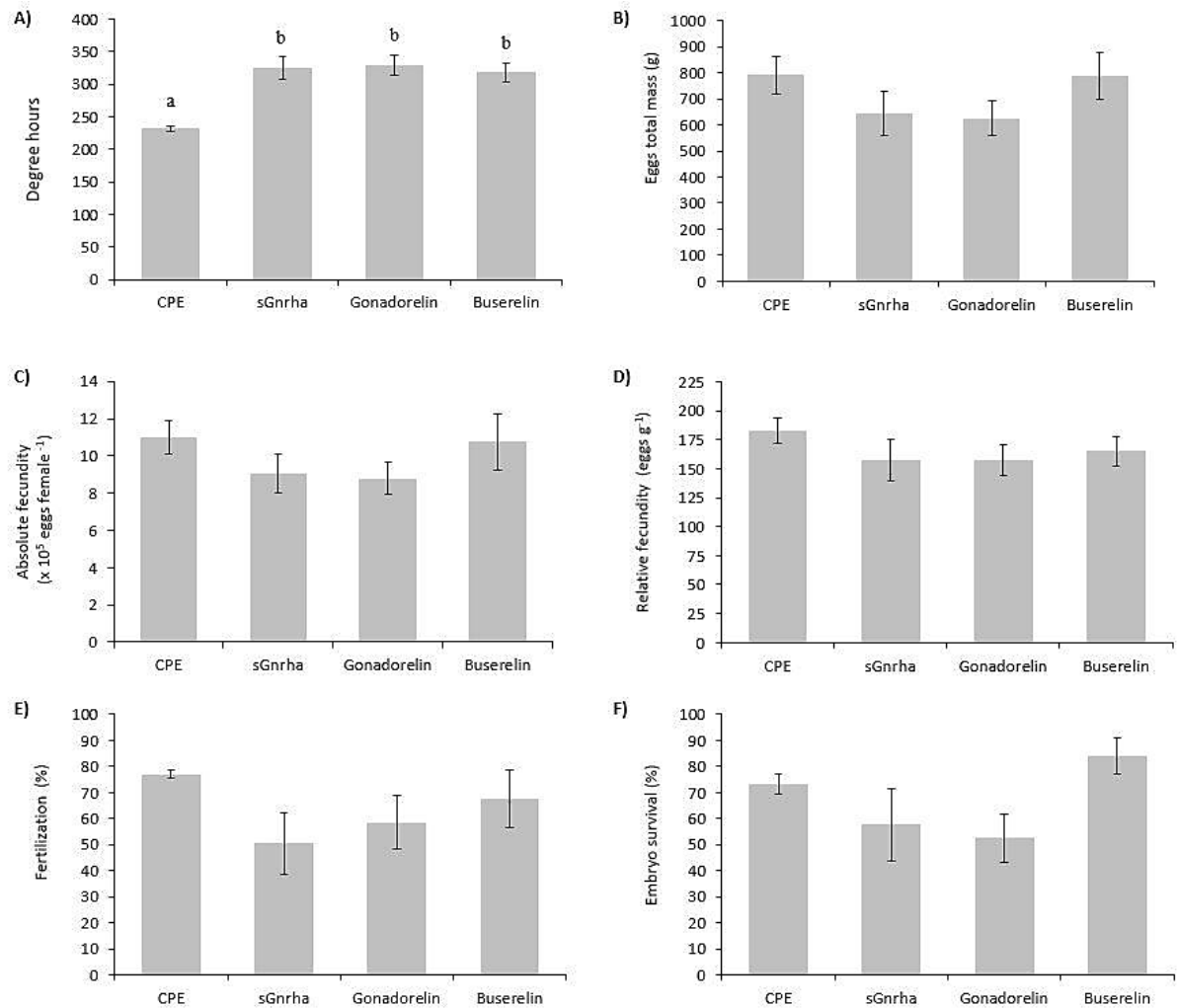


Figure 1. Mean (\pm SEM) egg parameters of *C. macropomum* females treated with carp pituitary extract – CPE ($n = 7$), sGnRHa ($n = 6$), gonadorelin ($n = 6$) and buserelin acetate ($n = 4$). A. Degree-hour from hormone treatment to strip spawning ($^{\circ}\text{C} \times \text{hours}$); B. Eggs total mass; C. Absolute fecundity; D. Relative fecundity; E. Fertilization rate (%); F. Embryo survival at 348 degree-hour post fertilization. Boxes labelled with different letters are statistically different from each other ($p < 0.05$)

3.3. Plasma level of 17 β -estradiol, 17 α OHP and 17 α 20 β P

The levels of estradiol (E₂) before hormone injection was similar in all females (0.85 \pm 0.47 ng/mL, $p = 0.637$). All treatments increased drastically the E₂ plasma levels as follows: CPE 26.6 \pm 10.8-fold change, sGnRH α 52.7 \pm 27.3-fold change, gonadorelin 56.1 \pm 15.2-fold change and buserelin acetate 51.9 \pm 18.3-fold change. Although there was a difference between the values before and after treatment in all groups ($p \leq 0.02$), there was no difference in fold induction between the groups ($p = 0.666$; Figure 2).

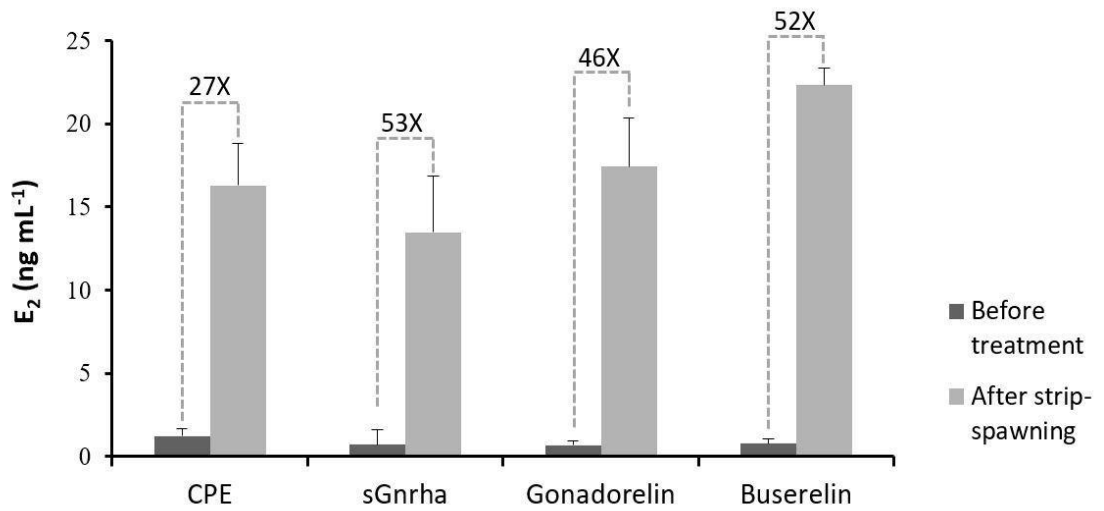


Figure 2. Mean (\pm SEM) plasma levels of 17 β -estradiol (E₂) in tambaqui *C. macropomum* mature females before hormone treatment (carp pituitary extract – CPE, sGnRH α , gonadorelin and buserelin acetate) and after strip spawning. Numbers on the broken line connecting two values indicate the fold difference between them ($p < 0.05$)

Likewise, the plasma levels of 17 α OHP and 17 α ,20 β P were similar in all fish before treatment and as low as 0.06 \pm 0.05 and 0.036 \pm 0.016 ng/mL, respectively ($p = 0.974$ and = 0.471, respectively). All treatments increased both progestin concentrations greatly in all treated females, even in the ones that did not release eggs ($p \leq 0.01$; Figure 3).

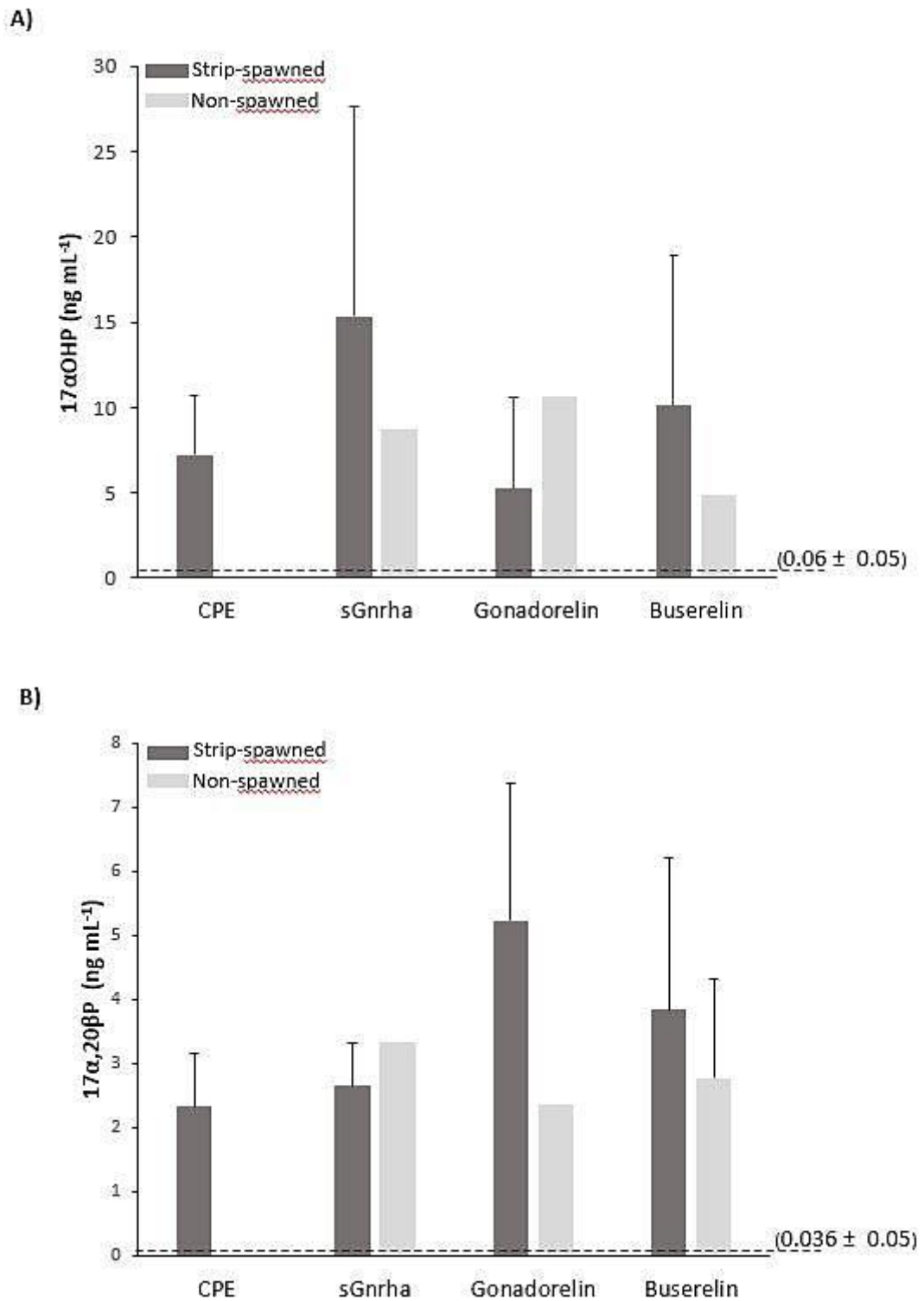


Figure 3. Mean (\pm SEM) plasma levels of progestins in strip spawned and non-spawned *C. macropomum* females treated with carp pituitary extract (CPE), sGnRH α , gonadorelin and buserelin acetate, just after stripping. A. 17 α -hydroxyprogesterone (17 α OHP); B. 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α ,20 β P). The broken line represents the level of each steroid before hormone treatment

4. Discussion

Synthetic GnRHs have been efficient in promoting ovulation and/or spawning of captive fish (reviewed in Mylonas et al., 2010), but among the neotropical species, the response to these compounds varies greatly (Acuña and Rangel, 2009; Andrade et al., 2014; Carolsfeld et al., 1988; Felizardo et al., 2012; Pereira et al., 2018, 2017). We tested three commercially available GnRHs to promote final oocyte maturation and/or ovulation and eventually eggs release under stripping in tambaqui *Colossoma macropomum*. Not all the females treated with GnRHs released eggs when stripped, even though they were at the same age, weight, relative condition factor and under the same culture conditions. The variation in response to a GnRH therapy in different fish species can be primarily attributed to a possible strong dopaminergic (DA) inhibitory mechanism, which needs to be suppressed in some species to overcome reproductive dysfunction and achieve spawning in captivity (Chaube et al., 2014; Peng et al., 1994; Sharaf, 2012; Sloley et al., 1992). However, in some fish, such as the sea bass *Dicentrarchus labrax*, the presence of DA antagonist does not improve the GnRH-induced final oocyte maturation (Prat et al., 2001), and in others, like salmonids, there is no DA block of the reproductive functions (Van Der Kraak et al., 1986; Peter et al., 1988; Vacher et al., 2002). In our study, all females treated with CPE, which stimulates directly the gonad and consequently avoids DA action on the brain-pituitary axis, released eggs. On the other hand, 85% of the females treated with either gonadorelin alone or sGnRH combined with domperidone (Ovaprim[®]) expressed eggs, indicating that the presence of an anti-DA compound does not increase the number of spawned females. It seems that in *C. macropomum*, the DA inhibitory tone on Lh secretion may not be strong or even not present at all, like the salmonids. If this is the case, indeed there is no need for a DA antagonist to stimulate ovulation and egg release upon stripping in farmed tambaqui.

The difference in the efficacy of the GnRHa's and CPE might therefore be related to a particular condition of the ovary. All females were mature according to the visual evaluation of maturation signals for the species (i.e. bulged abdomen and red and swollen urogenital papilla), eggs observation (presence of migrated germinal vesicles), and presented the same 17α OHP and $17\alpha,20\beta$ P levels. For this reason, we suspect that the ovary must be towards the end of vitellogenesis or even heading to ovulation in order to respond to the GnRHa's. Since the pituitary of mature fish contains not only Lh, but also Fsh, which has important roles at early and middle stages of vitellogenesis, the CPE is capable to push towards the end of the vitellogenesis and to promote the final maturation altogether. This would also explain the need of a priming dose when CPE is administered (Levavi-Zermonsky and Yaron, 1986). On the other hand, GnRHa, which stimulates Lh release may only function in follicles at certain late stages of maturation. It might be necessary to evaluate with more details the biopsied eggs and gauge other egg types present in the biopsy, as done by Gardes (2000), to point out the best moment of the mature ovary to respond to a GnRH therapy. We are currently investigating this theory, and if confirmed, the selection of the female is indeed the most crucial step for the success of the GnRHa treatment, as the optimal phase of responsiveness might be shorter than when pituitary extracts are used, similar to observed in carps (Aizen et al., 2017).

The degree-hour (DH) for stripping was higher in GnRHa-treated groups and corresponded to a longer latency period compared to CPE treatment. The GnRHa acts at a higher level on the reproductive axis therefore taking a longer period for the spawning, while the CPE has direct effects on the gonads, supplying high amounts of gonadotropins (Zohar and Mylonas, 2001). The advantage is that the DH for stripping the GnRHa-treated females (324 DH) was more precise than for the CPE, as the variation was lower within a higher number of females (all GnRHa groups together) than the CPE group.

In our study, all treatments promoted the same sharp increase in estradiol (E₂), 17 α -hydroxyprogesterone (17 α OHP) and 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α 20 β P) plasma levels at the time of strip spawning. All females had the same E₂ concentration before the treatment, which was very similar to tambaqui in oocyte primary growth (0.3 ng/mL; Almeida et al., 2016), and after the hormonal treatment. The main role of E₂ is in the synthesis of vitellogenin by the liver during vitellogenesis, i. e. at earlier stages of oocyte growth and vitellogenesis (Miura et al., 2007). However, an increase in E₂ at ovulation in artificially induced or naturally spawned females was also observed in carp *Cyprinus carpio* (Drori et al., 1994; Vazirzadeh, 2015), European bass *Dicentrarchus labrax* (Prat et al., 2001), goldfish *Carassius auratus* (Kobayashi et al., 1987) and in the south American freshwater *Leporinus elongatus* (Pereira et al., 2018). We can not assume that the E₂ concentration observed after stripping represents the normal estradiol levels in naturally spawning tambaqui, but it certainly demonstrates that the ovary of striped (farmed) tambaqui still maintains the aromatase activity - and therefore contains vitellogenic follicles - up to February. Indeed, farmed tambaqui can spawn under hormonal stimulation and stripping twice in the same reproductive season (Pires et al., 2018).

At the final stages of follicle maturation, the Lh stimulates the theca cells of the ovarian follicles to produce 17 α OHP, which is transported to the granulosa cells and converted, by the 20 β -hydroxysteroid-dehydrogenase (20 β -HSD) enzyme, to the maturation inducing steroid (MIS), which can be either the 17 α 20 β P or the 17 α 20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 β S), depending on the species considered (Levavi-Sivan et al., 2010; Lubzens et al., 2010; Nagahama, 1997; Nagahama and Yamashita, 2008). Via activation of membrane receptors, the MIS stimulates the formation and activation of the maturation-promoting factor (MPF), which is ultimately responsible for the resumption of meiosis and completion of oocyte maturation

(Nagahama, 1997; Nagahama et al., 1994). This is the first study that measured $17\alpha\text{OHP}$ and $17\alpha20\beta\text{P}$ concentration in mature (pre and post ovulated) farmed tambaqui.

Altogether, the data show that the steroidogenic response to all treatments were physiologically identical, and moreover similar between spawned and non-spawned fish. Specifically the fact that both progesterones, generally responsible for the final oocyte maturation and ovulation, increased in all the females, rules out the hypothesis that an insufficient level of one or both steroids might be the reason why some females didn't express eggs.

5. Conclusion

Summing up, the GnRH analogues gonadorelin, buserelin acetate and sGnRH (the last commercially combined with domperidone) are less effective than carp pituitary extract in stimulating the spawning in tambaqui mature female. However, even in very small doses they warrant the same quality and quantity of eggs as CPE, as well as promote similar increases on the plasma levels of E_2 , $17\alpha\text{OHP}$ and $17\alpha20\beta\text{P}$. A great advantage of the use of these synthetic drugs is that only one dose is necessary to achieve those responses, avoiding extra handling and stress to the fish. Furthermore, most likely tambaqui does not possess a strong dopaminergic anti-GnRH tone, but instead, a critical responsiveness-window of the follicles to the GnRH therapy.

Acknowledgements

We would like to express our gratitude to the staff of the Centre of Aquaculture Technology, Training and Production of Balbina (CTTPA), and Secretaria Executiva Adjunta

de Pesca e Aquicultura (Sepa) da Secretaria de Produção Rural do Estado do Amazonas (Sepror/AM) for their support on the study.

Funding Statement

This study was funded by Embrapa (SEG 10.19.03.004.00.00); by Fundação de Amparo à Pesquisa no Amazonas – FAPEAM (Amazonas Estratégico 004/2018 - no. 39886.UNI703.23148.10052018, and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (fellowship grant of the first author).

Data Availability Statement

The data that support this study will be shared upon request to the corresponding author.

References

- Acuña JJA, Rangel JLH. Effects of hypophysial extract of common carp and the analog of the GnRH on the final maturation oocyte and the spawning of cachama negra (*Colossoma macropomum*). Rev Cient La Fac Ciencias Vet La Univ Del Zulia 2009.
- Aizen J, Hollander-Cohen L, Shpilman M, Levavi-Sivan B. Biologically active recombinant carp LH as a spawning-inducing agent for carp. J Endocrinol 2017;232:391–402. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0435>.
- Almeida FL, Lopes JS, Crescencio R, Izel ACU, Chagas EC, Bojjink C. Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight. Aquaculture 2016;452:224–32. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.031>.

- Andrade ES, Carvalho AFS, Ferreira MR, Paula FG, Rodrigues FS, Felizardo VO, et al. Indutores hormonais na reprodução artificial de curimba (*Prochilodus lineatus*). Rev Bras Reprodução Anim 2014;38:230–6.
- Carolsfeld J, Ramos SM, Ormanezi R, Gomes JH, Barbosa JM, Harvey B. Analysis of protocols for application of an LHRH analog for induced final maturation and ovulation of female pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887). Aquaculture 1988;74:49–55. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90085-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90085-3).
- Chaube R, Singh RK, Joy KP. Effects of ovaprim, a commercial spawning inducer, on vasotocin and steroid hormone profiles in the catfish *Heteropneustes fossilis*: In vivo and in vitro studies. Gen Comp Endocrinol 2014;195:190–200. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.11.009>.
- Chenault JR, Kratzer DD, Rzepkowski RA, Goodwin MC. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. Theriogenology 1990. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90579-I](https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90579-I).
- Le Cren ED. The Length-Weight Relationship and Seasonal Cycle in Gonad Weight and Condition in the Perch (*Perca fluviatilis*). J Anim Ecol 1951;20:201–19. <https://doi.org/10.2307/1540>.
- Donaldson EM, Hunter GA. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. Fish Physiol 1983;9:351–403. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60307-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60307-6).
- Drori S, Ofir M, Levavi-Sivan B, Yaron Z. Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide: analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature. Aquaculture 1994;119:393–407. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90303-4).
- Dufour S, Sebert ME, Weltzien FA, Rousseau K, Pasqualini C. Neuroendocrine control by

- dopamine of teleost reproduction. *J Fish Biol* 2010;76. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02499.x>.
- Fakriadis I, Miccoli A, Karapanagiotis S, Tsele N, Mylonas CC. Optimization of a GnRHa treatment for spawning commercially reared greater amberjack *Seriola dumerili*: Dose response and extent of the reproductive season. *Aquaculture* 2020;521. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735011>.
- Felizardo VO, Murgas LDS, Andrade ES, López PA, Freitas RTF, Ferreira MR. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). *Theriogenology* 2012;77:1570–4. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.025>.
- Fernandez-Palacios H, Schuchardt D, Roo J, Izquierdo M, Hernandez-Cruz C, Duncan N. Dose-dependent effect of a single GnRHa injection on the spawning of meagre (*Argyrosomus regius*) broodstock reared in captivity. *Spanish J Agric Res* 2014;12:1038–48. <https://doi.org/10.5424/sjar/2014124-6276>.
- Gardes L. Induced spawning of red drum, *Sciaenops ocellatus*: use of multivariate and univariate analysis methods in the search for side effects of LH-RHa treatments and ovarian development state upon spawn quality. *Aquat Living Resour* 2000;13:19–27. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(00\)00137-6](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(00)00137-6).
- Harvey B, Carosfeld J. Induced breeding in tropical fish. Ottawa: International Development Research Centre; 1993.
- Ibarra-Castro L, Duncan NJ. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture* 2007;272:737–46. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.007>.
- Kobayashi M, Aida K, Hanyu I. Hormone changes during ovulation and effects of steroid hormones on plasma gonadotropin levels and ovulation in goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 1987;67:24–32. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(87\)90201-2](https://doi.org/10.1016/0016-6480(87)90201-2).

- Kraak G Van Der, Donaldson EM, Chang JP. Dopamine involvement in the regulation of gonadotropin secretion in *coho salmon*. *Can J Zool* 1986;64:1245–8. <https://doi.org/10.1139/z86-185>.
- Levavi-Sivan B, Bogerd J, Mañanós EL, Gómez A, Lareyre JJ. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *Gen Comp Endocrinol* 2010;165:412–37. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.07.019>.
- Levavi-Sivan B, Safarian H, Rosenfeld H, Elizur A, Avitan A. Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-Receptor Gene Expression in Tilapia: Effect of GnRH and Dopamine. *Biol Reprod* 2004;70:1545–51. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.021998>.
- Levavi-Zermonsky B, Yaron Z. Changes in gonadotropin and ovarian steroids associated with oocytes maturation during spawning induction in the carp. *Gen Comp Endocrinol* 1986;62:89–98. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(86\)90097-3](https://doi.org/10.1016/0016-6480(86)90097-3).
- Lin HR; Peter RE. Hormones and spawning in fish. *Asian Fish Sci* 1996;9:21–33.
- Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdà J. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen Comp Endocrinol* 2010;165:367–89. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022>.
- Mañanós E. Luteinizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue. *J Fish Biol* 2002;60:328–39. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2001.1839>.
- Miura C, Higashino T, Miura T. A progestin and an estrogen regulate early stages of oogenesis in fish. *Biol Reprod* 2007;77:822–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.061408>.
- Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen Comp Endocrinol* 2010;165:516–34. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.007>.
- Mylonas CC, Zohar Y. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and

- spermiation in basses of the genus *Morone*. *Aquaculture* 2001;202:205–20. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00772-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00772-4).
- Nagahama Y. $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 1997;62:190–6. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(96\)00180-8](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(96)00180-8).
- Nagahama Y, Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev Growth Differ* 2008;50. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x>.
- Nagahama Y, Yoshikuni M, Yamashita M, Tanaka M. 13 Regulation of Oocyte Maturation in Fish. vol. XI, 1994, p. 393–439. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60074-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60074-6).
- Ngamvongchon S, Pawaputanon O, Leelapatra W, Johnson WE. Effectiveness of an LHRH analogue for the induced spawning of carp and catfish in Northeast Thailand. *Aquaculture* 1988;74:35–40. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90083-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90083-X).
- Nyuji M, Yamamoto I, Hamada K, Kazeto Y, Okuzawa K. Effect of GnRHa on plasma levels of Fsh and Lh in the female greater amberjack *Seriola dumerili*. *J Fish Biol* 2019;95:1350–4. <https://doi.org/10.1111/jfb.14137>.
- Peng C, Gallin W, Blomqvist AG, Peter RE, Larhammar DAN. Gene Expression in the Goldfish Brain : and Regulation by Ovarian Steroids. *Endocrinology* 1994;134:1095–113.
- Pereira TSB, Boscolo CNP, Moreira RG, Batlouni SR. *Leporinus elongatus* induced spawning using carp pituitary extract or mammalian GnRH analogue combined with dopamine receptor antagonists. *Anim Reprod* 2018;15:64–70. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-2017-AR983>.
- Pereira TSB, Boscolo CNP, Moreira RG, Batlouni SR. The use of mGnRHa provokes ovulation but not viable embryos in *Leporinus macrocephalus*. *Aquac Int* 2017;25:515–29. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0049-2>.
- Peter RE, Lin HR, Van Der Kraak G. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater

- fish in China: Advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture* 1988. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90080-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90080-4).
- Peter RE, Yu KL. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: Basic and applied aspects. *Rev Fish Biol Fish* 1997;7:173–97. <https://doi.org/10.1023/A:1018431610220>.
- Pires LB, Corrêa Filho RAC, Sanches EA, Romagosa E, Silva TG da, Rech S, et al. *Colossoma macropomum* females can reproduce more than once in the same reproductive period. *Anim Reprod Sci* 2018;196:138–42. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.07.006>.
- Prat F, Zanuy S, Carrillo M. Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) and pimozide on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 2001;198:325–38. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00600-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00600-1).
- Romagnoli S, Stelletta C, Milani C, Gelli D, Falomo ME, Mollo A. Clinical use of deslorelin for the control of reproduction in the bitch. *Reprod Domest Anim* 2009;44:36–9. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01441.x>.
- Roubach R, Gomes LC, Leão Fonseca FA, Val AL. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquac Res* 2005;36:1056–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01319.x>.
- Scott BE, Marteinsdottir G, Begg GA, Wright PJ, Kjesbu OS. Effects of population size/age structure, condition and temporal dynamics of spawning on reproductive output in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Ecol Modell* 2006;191:383–415. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.05.015>.
- Sharaf SM. Effect of GnRHa, pimozide and Ovaprim on ovulation and plasma sex steroid hormones in African catfish *Clarias gariepinus*. *Theriogenology* 2012;77:1709–16. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.019>.
- Sink TD, Lochmann RT, Fecteau KA. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked

- immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. *Fish Physiol Biochem* 2008;34:95–101. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9150-9>.
- Sloley BD, Kah O, Trudeau VL, Dulka JG, Peter RE. Amino Acid Neurotransmitters and Dopamine in Brain and Pituitary of the Goldfish: Involvement in the Regulation of Gonadotropin Secretion. *J Neurochem* 1992;58:2254–62. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10971.x>.
- Stoeckel JN. A Method for Viewing the Germinal Vesicle in Oocytes of Commercial Catfishes. *N Am J Aquac* 2000;62:240–7. [https://doi.org/10.1577/1548-8454\(2000\)062<0240:amfvgt>2.3.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(2000)062<0240:amfvgt>2.3.co;2).
- Vacher C, Ferrière F, Marmignon MH, Pellegrini E, Saligaut C. Dopamine D2 receptors and secretion of FSH and LH: Role of sexual steroids on the pituitary of the female rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 2002;127:198–206. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(02\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(02)00046-1).
- Vazirzadeh A. Profiles of Sex Steroids in Wild-caught Carp *Cyprinus carpio carpio* Linnaeus 1758 During Ovulation Induction by Acute Versus Sustained Delivery Methods of Different GnRHa Analogues. *Asian Fish Sci* 2015;28:26–36.
- Villacorta-Correa MA, Saint-Paul U. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) in central Amazon, Brazil. *Rev Bras Biol* 1999;59:637–52. <https://doi.org/10.1590/S0034-71081999000400013>.
- Wojnárovich A, Van Anrooy R. Field guide to the culture of tambaqui *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816. vol. 624. 2019.
- Wojnarovich E. Tambaqui e pirapitinga: Propagação artificial e criação de alevinos. codevasf; 1986.

Zaniboni Filho E, Barbosa DC. Priming hormone administration to induce spawning of some brazilian migratory fish. *Rev Bras Biol* 1996;56:655–659.

Zohar Y, Muñoz-Cueto JA, Elizur A, Kah O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 2010;165:438–55.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.017>.

Zohar Y, Mylonas CC. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: From hormones to genes. *Aquaculture* 2001. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00584-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00584-1).

CAPÍTULO III

Effects of gonadorelin on the expression of *fsh β* and *lh β* in mature male and female tambaqui *Colossoma macropomum*

A ser submetido à Revista *Molecular reproduction and development*

Effects of gonadorelin on the expression of *fsh β* and *lh β* in mature tambaqui *Colossoma macropomum*

Rosilane Gomes de Souza de Oliveira^a; Irani Souza de Moraes^{a,b}; Romulo Paixão^a; Izabel Bandeira^b; Fernanda Loureiro de Almeida^c

^aUniversidade Federal do Amazonas (UFAM), Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Avenida Rodrigo Otávio, 6200 – Coroado, 69080-900. Manaus, Amazonas, Brazil.

^bUniversidade Estadual do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil

^cEmbrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM-010, Km 29, Caixa Postal 319, 69010-970. Manaus, Amazonas, Brazil.

Corresponding author: Fernanda Loureiro de Almeida, Email: fernanda.almeida@embrapa.br.

Abstract

Gonadorelin is a synthetic analogue of the gonadotropin releasing hormone (Arg⁸-Pro⁹-Gly¹⁰-NH₂, mGnRH) widely used for estrus synchronization in mammals that has been recently tested as a promoter of fish spawning. In order to achieve the final maturation and ovulation of farmed rheophilic species, exogenous LH or other compounds that stimulate endogenous production of Lh must be administered. To investigate the effect of gonadorelin on tambaqui *Colossoma macropomum* gonadotropin production, we treated tambaqui mature females (n = 6) and males (n = 3) with 60 and 15 µL/kg BW of gonadorelin, respectively, and 11 hours later collected their pituitary for analysis of *fshβ* and *lhβ* transcription. We also sampled mature, non-treated females (n = 8) and males (n = 6) for the same analysis, and these fish were considered as controls. Eleven hours after injection, the gonadorelin up-regulated *lhβ* expression in males and females, but statistical significance was achieved only in the males. On the other hand, *fshβ* expression was downregulated in both genders, but only in the females there was significance. The results indicate that *lhβ* expression increases 11 hours after gonadorelin administration in mature tambaqui, indicating the potential of this hormone as a promoter of tambaqui final maturation, ovulation and spermiation.

Keywords: GnRH analogue; GtH expression; neotropical fish; artificial reproduction

1. Introduction

In vertebrates, gametogenesis and steroidogenesis marks puberty and the onset of adult life. Both events are mainly coordinated by the gonadotropic pituitary hormones, follicle-stimulating hormone (Fsh) and luteinizing hormone (Lh). These gonadotropins are glycoproteins synthesized and secreted by the anterior pituitary gland in response to the hypothalamic release of gonadotropin releasing hormone (GnRH; Peter & Yu, 1997). Fsh and Lh are heterodimeric proteins constituted by a common α subunit, non-covalently linked to a hormone-specific β subunit, which confers biological specificity to each of them. Each subunit is therefore encoded by a different gene. Soon after synthesis, the peptide chain is folded, glycosylated and assembled to form the dimeric conformation, required for the biological activity of the hormone (Mañanós, Duncan, & Mylonas, 2008). Although both hormones are produced by the pituitary, their function changes according to the development of the gonad. The Fsh triggers the beginning of gonadal maturation, i. e. the first phases of spermatogenesis and folliculogenesis, while the Lh promotes final maturation, ovulation and spermiation (Levavi-Sivan, Bogerd, Mañanós, Gómez, & Lareyre, 2010).

In fish, environmental features exert great influence on the release of GnRH, therefore impacting Fsh and Lh production, and consequently regulating the reproductive physiology of these aquatic vertebrates. In aquaculture conditions the lack of environmental stimuli blocks the release of Lh by the pituitary in most species, and the final steps of maturation and ovulation are not completed (Mylonas, Fostier, & Zanuy, 2010). In such species, the spawning of farmed fish must be artificially induced with exogenous hormones.

Tambaqui *Colossoma macropomum* is the main native fish in Brazilian aquaculture. The total production was 100.5 K tons and the income of R\$ 782.5 million (IBGE, 2020), reflecting its economic importance. As a rheophilic species, tambaqui must comply with upstream migration over long distances to receive the necessary stimuli for final maturation and

spawning (Villacorta-Correa & Saint-Paul, 1999). Under cultivation, the ovarian follicles undergo growth and development but ovulation does not occur, except throughout the administration of exogenous hormones. Hence, the reproduction of farmed tambaqui for the production of fries to support meat production is based on an artificial induction of spawning, made mostly by the use of carp pituitary extract (CPE) (Zaniboni Filho & Barbosa, 1995), which contains high amounts of Fsh and Lh. In spite of being efficient in inducing tambaqui spawning, CPE has serious disadvantages such as its purity, components identity, continuity of supply, potency, and microbiological safety (Aizen, Hollander-Cohen, Shpilman, & Levavi-Sivan, 2017; Donaldson & Hunter, 1983). Therefore, research efforts must be conducted aiming at finding efficient and safer compound(s) to substitute CPE for tambaqui artificial reproduction.

Gonadorelin is a synthetic analogue of the GnRH [Arg⁸-Pro⁹-Gly¹⁰-NH₂, mGnRH]. It is commercially available and vastly used in terrestrial livestock, such as dairy and beef cattle to regulate estrus. For fish, gonadorelin has also been tested as spawning-inducer of South American neotropical species, namely *Piaractus mesopotamicus* (Carolsfeld et al., 1988), *Prochilodus lineatus* (Andrade et al., 2014), *Astyanax bimaculatus* (Felizardo et al., 2012), and recently tambaqui (our unpublished data). However, the effect of gonadorelin on the pituitary production of gonadotropins in mature tambaqui has not been investigated. Hence, the aim of this study was to quantify the relative expression of *fshβ* and *lhβ* in the pituitary of mature male and female tambaqui before and after treatment with gonadorelin, to identify the potential of this hormone as a spawning inducer for the species.

2. Material and methods

The authors state that all procedures of this work comply with the Ethical Principles of Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) – Embrapa Amazônia Ocidental (n° 05/2018, SEI 21158.003669/2018-77).

2.1. Management and selection of animals

The experiment was carried out at Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Brazil. The fish were acquired from a commercial farm, and were kept in a 1430 m² ground pond in a density of 170 g/m². Feeding was done with commercial fish feed with 28% of crude protein, at 1.5% of biomass, twice a day, until apparent satiety.

A total of 14 mature females and 9 mature males of *C. macropomum* (3 to 7 years-old) were selected according to visual characteristics of gonad maturation (Woynarovich and Van Anrooy, 2019) and kept in indoor tanks (12 m²) with water renewal and aeration at average temperature of 28 °C. Males and females were kept in different tanks, where they received the hormonal treatment at random.

2.2. Hormonal treatment

Six females and three males received a single injection, at the base of the pectoral fin, of a commercial GnRH α based on gonadorelin Arg⁸-Pro⁹-Gly¹⁰-NH₂, mGnRH (Profertil® Fabiani Saúde Animal, São Paulo, SP, Brazil). The females received a dose of 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ BW (body weight) and the males 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ BW. The remaining fish represented the non-treated (control) fish. The doses were based on our previous experiments, which show efficacy in inducing spawning. The effects of gonadorelin were analyzed separately for males and females.

2.3. Sampling

The water temperature in the tanks was maintained at 28.0°C with thermostats. The control fish were deep-sedated with eugenol (270 mg/L; Roubach, Gomes, Leão Fonseca, & Val, 2005) and euthanized by medular seccioning. Pituitary was carefully dissected and immersed in RNA later for storing until RNA extraction. Liver and gonads were removed and weighted for estimation of gonadosomatic index ($GSI = \text{gonad weight} \times 100/\text{total BW}$) and hepatosomatic index ($HSI = \text{liver weight} \times 100/\text{total BW}$).

The treated group was sampled only 11 hours (at 28 °C) after receiving the hormonal treatment, as this was necessary time to achieve the required degree-hour for strip-spawning. For pituitary sampling, the fish were sedated, killed and sampled as described for the controls.

2.4. RT-qPCR

Pituitary total RNA was extracted using mortar and pestle for tissue maceration with TRIzol reagent (Life Technologies; Carsbald, USA) in a proportion of 1ml per 30 mg of tissue. Total RNA samples were treated with RNase-free DNA (RQ1 RNase-free; Promega, Madison, USA) to remove possible genomic DNA residues. The concentration and integrity of the RNA were assessed by spectrophotometry (Nanodrop 1000; Thermo Scientific) and in agarose gel electrophoresis (1.5%), respectively.

cDNA synthesis was done with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's protocol. The cDNAs were used as a template to amplify and quantify the transcript levels of *fshβ* and *lhβ*. For this, qPCR primers (Supplementary Table) were designed using the Integrated DNA Technologies (IDT) tool (<https://www.idtdna.com>), based on tambaqui genomic nucleotide sequences. Amplification efficiency for each primer set was calculated from a 1:4 serial dilution of a pool of cDNA of tambaqui ovaries and testes (Supplementary Table).

The qPCR reactions were performed in duplicates in the 7500 Fast Real-Time PCR System v2.3 (Applied Biosystems), using 2 μ L of cDNA (120 ng), 1 μ L of each primer (200 nM), 12,5 μ L Fast SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), and nuclease-free water to a final volume of 25 μ L. For each assay, the melt curves were inspected to ensure amplification of single amplicons. The data was analyzed using the $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ method (Livak e Schmittgen, 2001), where the expression of the target gene was first normalized to the *β -actin* (Nascimento, Silva, Gualberto, & Almeida, 2016) and then calibrated to the mean of the non-treated group of each sex (male and female groups).

2.5. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM (standard error of the mean). All data were first checked for homogeneity (Levene) and normality (Kolmogorov-Smirnov) and later analyzed for statistical significance using Student's T test when data presented normal distribution, or Mann-Whitney U test for nonparametric data (significance levels were <0.05). We used the SigmaStat program (version 3.5).

3. Results

3.1. Biometrical indexes

There was no difference in the weight or length of the treated and non-treated males, as well as both groups of the females. The females used as control had higher gonadosomatic (GSI) and hepatosomatic (HSI) indexes ($p=0.022$ and $p=0.007$, respectively). Among the males, there was no difference in GSI and HSI (Table 1).

Table 1. Morphometric parameters and gonadosomatic and hepatosomatic indexes (means \pm SEM) of mature *Colossoma macropomum* treated and non-treated with gonadorelin

	Females		Males	
	Control	Treated	Control	Treated
BW (kg)	2,45 \pm 0,87	3,83 \pm 0,7	2,39 \pm 0,41	1,94 \pm 0,13
SL (cm)	40,8 \pm 0,5	49,3 \pm 4,5	41,5 \pm 2,1	39,8 \pm 0,9
GSI	9,00 \pm 1,23 ^a	4,95 \pm 0,67 ^b	0,174 \pm 0,02	0,146 \pm 0,0
HSI	2,11 \pm 0,19 ^a	1,36 \pm 0,06 ^b	2,21 \pm 0,40	1,57 \pm 0,17
<i>n</i>	8	6	6	3

BW, body weight; SL, standard length; GSI, gonadosomatic index; HSI, hepatosomatic index. Superscript letters indicate significant differences between the two female groups ($p < 0.05$)

3.2. Relative expression of *fsh β* and *lh β*

In the females, the expression of *fsh β* decreased 2.3-fold ($p = 0.029$) with gonadorelin treatment, whereas the *lh β* increased 1.6 fold, albeit without statistical significance. In the males, the gonadorelin had the same effect, i. e. reduced *fsh β* and increased *lh β* transcription. However, in the males, significance was reached only for the effect on the *lh β* expression (Figure 1).

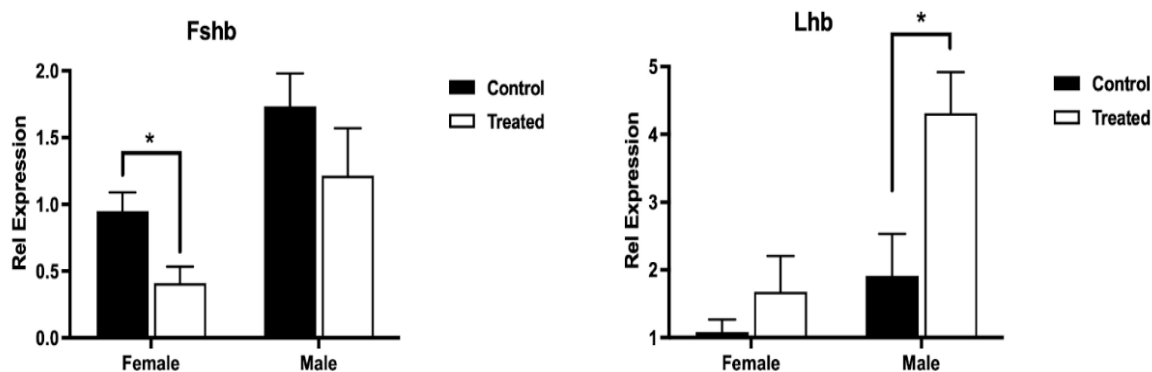


Fig. 1 *Colossoma macropomum* *fshβ* and *lhβ* gene expression (means \pm SEM) treated and non-treated with gonadorelin ($60\mu\text{g kg}^{-1}$ females and $15\mu\text{g kg}^{-1}$ males). Black bars represent the control group and white bars the treated group. Asterisks indicate differences between adjacent bars ($p < 0.05$)

4. Discussion

In vertebrates, the beginning of the reproductive cycle is characterized by the increase of Fsh levels, which are maintained high during gametogenesis, while Lh remains undetectable. With further gonad maturation, Fsh plasma concentration reduces and Lh level raises until it reaches an acute peak prior to ovulation (Mañanós et al., 2008; Nagahama & Yamashita, 2008). In an effort to find solutions for the artificial reproduction of tambaqui, our research aims to study the effects of synthetic drugs on the induced strip-spawning of tambaqui, the main native species for Brazilian aquaculture. The main biological question that so far remained open was the effects of synthetic GnRHs in the expression and secretion of gonadotropins, which are the main hormones coordinating gonad development and activity. Here, we measured the relative expression of *fshβ* and *lhβ* mRNAs in mature tambaqui treated with gonadorelin to the expression of non-treated mature tambaqui. Our results show opposite effects on the regulation of both gonadotropins. On one hand gonadorelin downregulates the transcription of *fshβ* in females and tends to reduce *fshβ* in males. On the other hand, it causes an intensive upregulation of the *lhβ* subunit in males and the same tendency in the females. Similar to our results, the

treatment of *Oreochromis niloticus* (Aizen et al., 2017), *Pagrus major* (Okuzawa et al 2016), *Seriola dumerili* (Nyuji, Yamamoto, Hamada, Kazeto, & Okuzawa, 2019), with GnRH analogs caused neuroendocrine changes, starting with a preovulatory rise in the pituitary contents of Lh and increased Lh plasma levels that eventually led to ovulation. Moreover, implants of GnRH in immature females of *Oncorhynchus nerka* not only upregulated *lhβ* transcription, but also down regulated *fshβ* (Kitahashi et al., 1998).

The relative effects of GnRH on gene transcription of the Fsh and Lh subunits depend not only on the species and reproductive status, but also on the sex of fish (Yaron et al 2003). Males of *Morone saxatilis*, at an early stage of spermatogenesis, treated with mammalian GnRHa showed an increase in mRNA of all gonadotropin subunits, with *lhβ* being higher. These results demonstrate that both *fshβ* and *lhβ* are differentially regulated by GnRHa (Hassin, Gothilf, Blaise, & Zohar, 1998). Moreover, mature females of *Astyanax altiparanae*, treated with GnRH2 (aka chicken GnRH-II) exhibited an increase in *lhβ* mRNA levels, while *fshβ* expression remained constant (Chehade et al., 2020). *Lhβ* mRNA expression increased 16 and 8 hours after injection in *Oryzias latipes* and *Clarias gariepinus*, respectively (Rebers, Hassing, Zandbergen, Goos, & Schulz, 2000). On the contrary, significant increases in both *fshβ* and *lhβ* mRNAs were observed in mature males (Kandel-Kfir et al., 2002).

The lack of significance of the *fshβ* downregulation in the males and of the *lhβ* in the females might be due to small differences in the mature status of the gonads. Although all fish were mature, there was a significant difference in the GSI of the treated and non-treated females, which were randomly distributed in the groups. The non-treated had heavier gonads, which might be a result of ovaries in more advanced stages of maturation in comparison with the others. Similarly, in common carp, no change in *fshβ* mRNA was observed in post-vitellogenic females, whereas *lhβ* mRNA significantly increased in response to GnRHa. However, even in quiescent *Dicentrarchus labrax*, the GnRHa increased the mRNA levels of *lhβ*, but not of the

fsh β subunits (Mateos, Mañanos, Carrillo, & Zanuy, 2002). Therefore, we suppose that the acute treatment with gonadorelin resulted in increased levels of *lh β* mRNA in females, which is in accordance with our results on the positive effect of the same dose of gonadorelin for the stripp-spawning of treated females. In addition to this, since both gonadotropins share a common alpha subunit, we can assume that while less Fsh are synthesized after gonadorelin treatment, more Lh are being produced, and possibly secreted, by the pituitary.

Summing up, the results indicate that *lh β* expression increases 11 hours after gonadorelin administration in mature tambaqui, indicating the potential of this hormone as a promoter of tambaqui final maturation, ovulation and spermiation.

Funding Statement

This study was funded by Embrapa (SEG 10.19.03.004.00.00); by Fundação de Amparo à Pesquisa no Amazonas – FAPEAM (Amazonas Estratégico 004/2018 - no. 39886.UNI703.23148.10052018, and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (fellowship grant of the first author).

References

- Aizen, J., Hollander-Cohen, L., Shpilman, M., & Levavi-Sivan, B. (2017). Biologically active recombinant carp LH as a spawning-inducing agent for carp. *Journal of Endocrinology*, 232(3), 391–402. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0435>
- Andrade, E. S., Carvalho, A. F. S., Ferreira, M. R., Paula, F. G., Rodrigues, F. S., Felizardo, V. O., Murgas, L. D. S. (2014). Indutores hormonais na reprodução artificial de curimba (*Prochilodus lineatus*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 38(4), 230–236. Retrieved from www.cbra.org.br
- Carolsfeld, J., Ramos, S. M., Ormanezi, R., Gomes, J. H., Barbosa, J. M., & 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(1–2), 49–55. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90085-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90085-3)
- Cehade, C., Amaral, F. G., Branco, G. S., Cassel, M., De Jesus, L. W. O., Costa, F. G., ... Borella, M. I. (2020). Molecular characterization of different preproGnRHs in *Astyanax altiparanae* (Characiformes): Effects of GnRH on female reproduction. *Molecular Reproduction and Development*, 87(6). <https://doi.org/10.1002/mrd.23351>
- Donaldson, E. M., & Hunter, G. A. (1983). Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. *Fish Physiology*, 9, 351–403. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60307-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60307-6)
- Felizardo, V. O., Murgas, L. D. S., Andrade, E. S., López, P. A., Freitas, R. T. F., & Ferreira, M. R. (2012). Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). *Theriogenology*, 77(8), 1570–1574. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.025>
- Hassin, S., Gothilf, Y., Blaise, O., & Zohar, Y. (1998). Gonadotropin-I and -II subunit gene expression of male striped bass (*Morone saxatilis*) after gonadotropin-releasing hormone analogue injection: Quantitation using an optimized ribonuclease protection assay. *Biology of Reproduction*, 58(5), 1233–1240. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.5.1233>
- IBGE. (2020). Indicadores IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (Março/2021). *Ibge*.
- Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mañanós, E. L., Gómez, A., & Lareyre, J. J. (2010). Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 412–437. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2009.07.019>
- Mañanós, E., Duncan, N., & Mylonas, C. (2008). *Reproduction and Control of Ovulation, Spermiation and Spawning in Cultured Fish*.

<https://doi.org/10.1201/9780849380549.sec1>

- Mateos, J., Mañanos, E., Carrillo, M., & Zanuy, S. (2002). Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean Sea bass. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 132(1), 75–86. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00535-8](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00535-8)
- Mylonas, C. C., Fostier, A., & Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 516–534. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.007>
- Nagahama, Y., & Yamashita, M. (2008). Regulation of oocyte maturation in fish. *Development Growth and Differentiation*, 50(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x>
- Nascimento, A. R., Silva, G. F., Gualberto, G. F., & Almeida, F. L. (2016). Validation of reference genes for real-time quantitative PCR in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Genetics and Molecular Research*, 15(4). <https://doi.org/10.4238/gmr15049228>
- Nyuji, M., Yamamoto, I., Hamada, K., Kazeto, Y., & Okuzawa, K. (2019). Effect of GnRH α on plasma levels of Fsh and Lh in the female greater amberjack *Seriola dumerili*. *Journal of Fish Biology*, 95(5), 1350–1354. <https://doi.org/10.1111/jfb.14137>
- Peter, R. E., & Yu, K. L. (1997). Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: Basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7(2), 173–197. <https://doi.org/10.1023/A:1018431610220>
- Roubach, R., Gomes, L. C., Leão Fonseca, F. A., & Val, A. L. (2005). Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 36(11), 1056–1061. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01319.x>
- Villacorta-Correa, M. A., & Saint-Paul, U. (1999). Structural indexes and sexual maturity of

tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) in central Amazon, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, 59(4), 637–652.

<https://doi.org/10.1590/S0034-71081999000400013>

Zaniboni Filho, E., & Barbosa, D. C. (1996). Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish *Revista Brasileira de Biologia*, 56(4), 655–659.

Supplementary Table

Primer	Sequence 5'-3'	Amplicon size	R ²
Fsh β Forward Primer	CCAGACACAGGAGAGAGC	140 bp	0,9998
Fsh β Reverse Primer	CCACAGGGTAAGTGAAGGAC		
Lh β Forward Primer	TGCTTTGGCACCGTACTCAC	163 bp	0,9990
Lh β Reverse Primer	TCTTGTACACCGGCTCCTTG		

CAPÍTULO IV

Análise de custo-benefício do uso de extrato hipofisário de carpa e de análogos de GnRH na desova induzida de tambaqui *Colossoma macropomum*

Publicado na Revista *Scientific Electronic Archives*

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/16520231689>

Article link: <https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/1689>

Análise de custo-benefício do uso de extrato hipofisário de carpa e de análogos de GnRH na desova induzida de tambaqui *Colossoma macropomum*

Cost-benefit analysis of the use of carp pituitary extract and GnRH analogues in the induced spawning of tambaqui *Colossoma macropomum*

Rosilane Gomes de Souza de Oliveira

Universidade Federal do Amazonas

José Olenilson Costa Pinheiro

Embrapa Amazônia Ocidental

Manoel Xavier Pedroza Filho

Embrapa Pesca e Aquicultura

Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan

Embrapa Amazônia Ocidental

Resumo

Na piscicultura, algumas espécies não desovam em condições de cultivo devido à falta de estímulos naturais essenciais para a maturação final dos gametas e a ovulação. Nesse caso, são necessários tratamentos com hormônios exógenos para a obtenção de larvas, que então mantêm toda a cadeia produtiva. Atualmente, a produção de larvas de tambaqui baseia-se na administração de extrato hipofisário de carpa (EHC), que é um produto biológico eficiente, porém sem identificação e quantificação dos bioativos nele presentes, além de representar um possível veiculador de doenças provenientes do peixe doador (carpa) ao tambaqui. Todavia, existem no mercado hormônios sintéticos (análogos de GnRH) capazes de induzir a reprodução do tambaqui em cativeiro e, que já foram testados para esse fim, com bons resultados. No entanto, ainda falta a análise do custo-benefício do uso dessas substâncias na reprodução induzida de peixes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o custo-benefício do uso de hormônios sintéticos comerciais análogos ao GnRH em relação ao EHC. Para isso, 28 fêmeas foram induzidas com gonadorelina (Profertil®), acetato de buserelina (Sincroforte®), análogo de GnRH de salmão - sGnRHa (Ovaprim®) e EHC (n = 7/tratamento). Foram avaliados o custo da dose por quilo de peso vivo (PV) e a resposta de desova a cada tratamento hormonal,

considerando taxa de desova, fecundidade relativa, taxa de fertilização e taxa de eclosão. O sGnRHa foi o tratamento mais oneroso na produção de larvas eclodidas, seguido pela gonadorelina e EHC, enquanto a buserelina apresentou um custo até 90% inferior aos demais produtos.

Palavras-chave: piscicultura, economia, extrato hipofisário

Abstract

Abstract. In the fish farming industry, some species do not spawn under farming conditions due to the lack of natural stimuli, which is essential for the final maturation of gametes and ovulation. In such cases, treatments with exogenous hormones are necessary to obtain larvae, which then maintain the entire production line. Currently, the production of tambaqui larvae is based on the administration of carp pituitary extract (CPE), which is an efficient biological product, but without identification and quantification of the bioactives present in it, in addition to representing a possible carrier of diseases from the donor fish (carp) to tambaqui. However, on the market there are synthetic hormones (GnRH analogues) able to induce the reproduction of tambaqui in captivity, and that have already been tested for this purpose, with good results. However, the analysis of the cost-efficiency of the use of these substances in the induced reproduction of fish are still lacking. The goal of this work was to evaluate the cost-effectiveness of using commercial synthetic hormones analogues to GnRH compared to CPE. For this, 28 females were induced with gonadorelin (Profertil®), buserelin acetate (Sincroforte®), salmon GnRH analogue - sGnRHa (Ovaprim®) and CPE (n = 7/treatment). The cost of each dose per kilogram of body weight (BW) and the spawning response to each hormonal treatment, considering spawning rate, relative fecundity, fertilization rate and hatching rate, were evaluated. sGnRHa was the most expensive treatment in the production of hatched larvae, followed by gonadorelin and CPE, while buserelin had a price up to 90% lower than the other products.

Keywords: fish farming, economics, pituitary extract.

Introdução

O tambaqui *Colossoma macropomum* é um caracídeo amazônico que reúne características favoráveis ao cultivo como rápido crescimento, rusticidade, hábito alimentar onívoro, dentre outras (Araújo-Lima & GOMES, 2005). A espécie tem destacada importância econômica na aquicultura brasileira, sendo a segunda espécie cultivada em todo território nacional, representando 12,3% da produção total de peixes sob cultivo (IBGE, 2021). Em 2021, foram produzidas mais de 94,6 mil toneladas de tambaqui, sendo a terceira espécie mais exportada da piscicultura nacional, com receita de US\$ 550 mil (IBGE, 2021; Peixe BR, 2022). Esses índices ressaltam a importância do fornecimento constante de formas jovens a fim de atender à crescente demanda do mercado.

O tambaqui é um peixe reofílico, de desova total, que em confinamento se reproduz somente com intervenção hormonal. O extrato hipofisário, geralmente de carpa (EHC), é o tratamento comumente utilizado para a indução de desova da espécie (Hilsdorf et al., 2022; Zaniboni Filho & Barbosa, 1996). Porém as desvantagens do uso de EHC são a inconsistência em sua potência (Peter & Yu, 1997) e a alta dependência da disponibilidade de peixes doadores, além de representar um risco de suspensão do fornecimento de hipófises por surto de doenças (Aizen et al., 2017) e a possível veiculação de patógenos aos peixes receptores (Donaldson & Hunter, 1983).

Na indução reprodutiva de peixes em cultivo são também utilizados hormônios sintéticos, análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH_a), disponíveis comercialmente, com concentração padronizada e durabilidade prolongada (Padula, 2005). Dentre eles, o Ovaprim® é um produto exclusivo para peixes, composto por análogo de GnRH de salmão e domperidona, um antagonista de dopamina. Sua eficácia foi comprovada em diferentes espécies exploradas comercialmente na aquicultura mundial (*Clarias gariepinus*, Sharaf, 2012; *Heteropneustes fossilis*, Hossain et al., 2013; *Pimelodus pictus*, Aya & Arias, 2011; *Acanthopagrus berda*, Abbas et al., 2019). O Profertil® (gonadorelina) é utilizado em protocolos de inseminação artificial de mamíferos, porém já tem sido testado na indução reprodutiva de peixes comerciais neo-tropicais (*Piaractus mesopotamicus*, Carolsfeld et al., 1988; *Astyanax bimaculatus*, Felizardo et al., 2012; *Prochilodus lineatus*, Andrade et al., 2014). E o Sincroforte® (acetato de buserelina) é utilizado na sincronização de cio de mamíferos e também na desova de peixes nativos (*Leporinus macrocephalus* e *L. elongatus*; Pereira et al., 2017, 2018), inclusive com prescrição para peixes em sua bula.

Cada espécie de peixe responde de maneira peculiar a cada hormônio testado, à dosagem empregada e às condições do ambiente de cultivo (temperatura, fotoperíodo, etc). Por isso, diferentes resultados são obtidos nas diferentes espécies. Até o momento, as pesquisas envolvendo indutores sintéticos para a reprodução artificial de peixes se restringem às análises de resposta fisiológica aos tratamentos, como informações sobre a ovulação e os índices reprodutivos, sem ressaltar seus possíveis impactos econômicos na produção. Entretanto, o sucesso da produção e o fortalecimento da cadeia produtiva de qualquer espécie aquícola dependem da capacidade de induzir a maturação final e desova com eficiência e economia.

Assim, o presente estudo, teve como objetivo avaliar o EHC, a gonadorelina, a busarelina e o sGnRHa na reprodução artificial de *Colossoma macropomum* e comparar os custos de cada composto utilizado.

Material e métodos

Princípios éticos

Essa pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) - Embrapa Amazônia Ocidental (nº 05 / 2018, SEI 21158.003669 / 2018-77) e foi aprovada dentro dos Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Manutenção dos animais, tratamentos hormonais e reprodução artificial

O experimento foi realizado no Centro de Tecnologia, Produção e Conservação de Recursos Pesqueiros do Amazonas (CTPC-AM), em Balbina, Presidente Figueiredo, Amazonas. Os peixes eram mantidos em tanques escavados de 2000 m², em uma densidade aproximada de 230g/m² e alimentados em dias alternados com ração comercial para peixes contendo 28% de proteína bruta, duas vezes/dia, até a saciedade aparente. A alimentação era suspensa nos dias de reprodução.

Os ensaios de seleção e desova induzida ocorreram em 2019-2020 (outubro a fevereiro), durante a estação reprodutiva da espécie. Foram selecionados 28 fêmeas (5,98 ± 0,2 kg) e 46 machos (4,13 ± 0,75 kg) aptos a indução hormonal, de acordo com os seguintes sinais externos de maturação gonadal: nas fêmeas, ventre macio e abaulado e papila genital hiperemiada; nos machos, emissão de sêmen após leve pressão abdominal (Woynárovich e Van Anrooy, 2019).

Os animais selecionados foram transferidos para tanques de cerâmica (tanques de tratamento), separadamente por sexo, com renovação constante de água.

As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos hormonais: T1 – EHC (extrato bruto de hipófise de carpa, Danúbio Aquacultura Ltda, Blumenau, SC) - 5,5 mg/kg, sendo 0,5 e 5,0 mg/kg, com intervalo de 12h; T2 – sGnRH (GnRH salmão combinado com domperidona, Ovaprim® Syndel Ltd., Nanaimo, BC, Canadá) - 5,0 µg/kg, dose única; T3 – Gonadorelina (GnRH mamífero, Profertil® Fabiani Saúde Animal, São Paulo, SP) - 60 µg/kg, dose única; T4 – Acetato de buserelina (GnRH mamífero, Sincroforte® Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP) - 0,7 µg/kg, dose única. Foram utilizadas 7 fêmeas para cada tratamento. Os machos receberam 2,0 mg/kg de EHC, dividido em 0,5 e 1,5 mg/kg, com intervalo de 12h. As injeções foram aplicadas na base da nadadeira peitoral.

Após as injeções, a temperatura da água foi registrada a cada hora para o registro das horas-grau. O momento ideal para a desova foi identificado pelo comportamento característico da fêmea, como natação cíclica e tremores corporais (Woynárovich e Van Anrooy, 2019).

Os ovos obtidos foram pesados e fertilizados com pool de sêmen de 2 ou 3 machos. Os gametas foram primeiramente misturados a seco e depois hidratados com água de incubação ($29,01 \pm 0,13$ °C; pH $6,61 \pm 0,1$) e distribuídos em triplicatas em incubadoras cônicas, a razão de 1g/L.

Levantamento de custos dos compostos e dos indicadores de eficiência

Para cálculo do custo de cada composto, primeiramente foram calculadas a fecundidade relativa e as taxas médias de desova, de fertilização e de eclosão, também, o número potencial de larvas por kg PV em cada tratamento, conforme descrito abaixo:

Fecundidade relativa: nº de ovos obtidos por fêmea. Foram contados o número de ovos contidos em três alíquotas (de 1 g) de ovócitos de cada fêmea. A média de cada fêmea foi então utilizada para extrapolar o valor para 1 kg de ovos.

Taxa de desova (%): n° fêmeas que desovaram $\times 100 / n^{\circ}$ fêmeas tratadas.

Taxa de fertilização (%): n° ovos fertilizados $\times 100 / n^{\circ}$ total de ovos da amostra. A taxa de fertilização foi avaliada na fase final de gastrulação, aproximadamente seis horas pós-fertilização. Foram avaliados e contados os ovos de três amostras de aproximadamente 100

ovos de cada incubadora. Para identificar os ovos fecundados, era avaliada a translucidez de cada ovo, uma vez que os ovos inviáveis são opacos.

Taxa de eclosão (%): n° embriões viáveis (móveis) \times 100 / n° total de embriões da amostra. A taxa de eclosão foi avaliada pouco antes dos embriões em movimento romperem o córion, aproximadamente doze horas pós-fertilização. Foram avaliados e contados os ovos de três amostras de cada incubadora.

N^o de larvas por kg PV: fecundidade relativa \times taxa de desova \times taxa de fertilização \times taxa de eclosão.

A estimativa do custo de cada composto foi determinada por dose (por quilo PV) considerando a média de preços de mercado de cada produto em Dezembro de 2021. Vale registrar que não foram considerados o custo dos hormônios utilizados nos machos, nem os custos de instalações, ração e mão de obra, uma vez que estes valores não se alteram com o tipo de hormônio utilizado.

O custo de cada composto para obtenção de um milhão de larvas foi calculado pela razão entre o custo da dose do produto utilizado para cada kg PV e o número potencial de larvas eclodidas por kg PV (Lee *et al.*, 1988). Conforme a fórmula abaixo:

Custo do composto: $\text{Custo da dose (kg PV)} \times 1.000.000 / n^{\circ} \text{ de larvas (kg PV)}$

Resultados

Os índices de eficiência e os custos de produção dos compostos analisados são apresentados na tabela 1. O sGnRHa apresentou o maior custo (R\$24,52/milhão de larvas), tendo sido influenciado pelo preço do produto e também pelas menores taxas de fertilização e eclosão.

O segundo maior custo foi da gonadorelina (R\$19,50/milhão de larvas), o qual também está diretamente relacionado ao preço do produto e seus indicadores de eficiência de fertilização e eclosão. O Extrato Hipofisário apresentou o terceiro menor custo (R \$13,20/milhão de larvas), mesmo sendo o produto com maior preço unitário (R\$10,34/kg PV). Esse melhor desempenho tem relação com os melhores indicadores de taxa de desova, fertilização e eclosão.

A buserelina apresentou o melhor resultado econômico, com um custo de apenas R\$2,33/milhão de larvas, o que representa 17% do custo do outro produto mais barato (Extrato Hipofisário). Apesar de ter apresentado a pior taxa de desova entre os quatro produtos, a buserelina teve seu resultado econômico compensado pela alta taxa de eclosão dos ovos (84%) e pelo baixo preço unitário do produto (R\$1,03/kg PV).

Tabela 1: Índices produtivos e custo de diferentes agentes hormonais na produção de larvas de tambaqui *Colossoma macropomum*

Agente	Custo/kg PV (R\$)	Taxa de desova (%)	Fecundidade (ovos.10 ³ /kg)	Taxa de fertilização (%)	Taxa de eclosão (%)	Estimativa de larvas (milheiros/kg)	Custo por milhão de larvas produzidas (R\$)
sGnRH (Ovaprim®)	8,77	86	1434,50	50	57	357,62	24,52
Gonadorelina (Profertil®)	7,28	86	1414,00	58	52	373,33	19,50
Ext. hipofisário (EBHC)	10,34	100	1390,57	77	73	782,85	13,20
Buserelina (Sincroforte®)	1,03	57	1367,25	67	84	441,59	2,33

Discussão

A compreensão da composição do custo de produção de uma atividade agropecuária é condição fundamental para a gestão do agronegócio. Os hormônios exógenos comumente usados na piscicultura nativa brasileira para obtenção de formas jovens, representam uma variável na composição do custo da indústria de alevinos e por isso devem ser considerados e avaliados como tal. Na desova induzida, a seleção do estimulante hormonal adequado determina o sucesso da ovulação.

Neste trabalho três compostos sintéticos comerciais e o extrato hipofisário de carpa (EHC) foram utilizados para induzir a desova de tambaqui. Foram avaliados o potencial de cada produto em induzir a desova, a qualidade e quantidade dos ovos e o custo da dose. Dentre os três compostos sintéticos avaliados, o sGnRH (Ovaprim®) foi o mais oneroso. Além disso, por ser produzido no Canadá, seu preço varia de acordo com a cotação de moeda estrangeira, e o

produto necessita de armazenamento em baixas temperaturas (abaixo de 20 °C), tornando seu uso no campo mais difícil, principalmente em regiões tropicais. O Profertil® foi o segundo produto mais oneroso, com índices produtivos semelhantes aos encontrados para Ovaprim®. O Profertil® é composto por diacetato de gonadorelina liofilizado e ampola diluente, e, uma vez diluído deve ser conservado em geladeira e utilizado no prazo de 7 dias, conforme instruções do fabricante. A busserelina (Sincroforte®) apresentou o menor valor na produção de larvas de tambaqui. Em comparação com o EBHC, seu custo foi 820% mais barato. Além do custo baixo na produção de milheiro de larvas de tambaqui, a busserelina tem outra grande vantagem. Se administrada, conforme nosso estudo, em dose única, reduz o manejo e, conseqüentemente, o estresse destas fêmeas. O Sincroforte® é uma solução injetável, pronta para uso e não necessita de geladeira.

O baixo preço da dose associado à alta qualidade dos ovos, indica que a busserelina tem um grande potencial para se tornar uma alternativa economicamente viável para a indústria de produção de larvas de tambaqui. Certamente estudos futuros devem adequar a dose da busserelina, para que sua eficácia seja similar ao extrato de hipófise. Nossos resultados indicam que todos os agentes sintéticos testados têm grande potencial como indutores alternativos na produção de larvas de tambaqui, restando a adequação da dose para aumentar os índices reprodutivos.

Importante destacar, além do preço acessível, a disponibilidade desses produtos no Brasil. Tanto busserelina, como gonadorelina são encontrados em lojas agropecuárias sob as marcas registradas Sincroforte®, Porceptal®, Prorelinn®, e Profertil®, Fertagyl®, Gestran®, respectivamente, todas fabricadas por empresas nacionais. Enquanto que o Ovaprim® e/ou os equivalentes Dagin®, Aquaspawn®, Ovopel® são adquiridos somente através de importação.

Atualmente o EBHC é o produto mais utilizado nas pisciculturas produtoras de alevinos de tambaqui por diversos motivos. Dentre eles, destacam-se: sua alta eficiência, a falta de outros compostos eficazes, e seu custo, relativamente baixo no custo operacional efetivo total (aproximadamente 1%) da produção de alevinos de tambaqui (Brabo et al., 2015). Apesar de ser eficiente e representar um percentual relativamente inexpressivo nos custos totais de produção de alevinos, a hipófise de carpa apresenta muitas desvantagens operacionais e biológicas. Ao contrário de hormônios sintéticos, o extrato hipofisário é um produto biológico, ou seja, dependente de recursos naturais (na maioria das vezes, carpa). Para se obter um grama de hipófise, é necessária a hipofisectomia de vários peixes doadores, que por sua vez devem

estar sexualmente maduros e, no período de pré-desova, quando cada hipófise apresenta níveis de gonadotrofinas desejáveis para induzir a desova nos peixes tratados (Donaldson e Hunter, 1983). Por ser um produto extrativo biológico e comercializado desidratado, a qualidade não é consistente entre as diferentes fontes (Aizen et al., 2017). Ademais, além dos hormônios de interesse à reprodução (gonadotrofinas) as hipófises contêm outros hormônios em quantidades desconhecidas e despadronizadas que podem prejudicar a desova (Donaldson e Hunter, 1983) e até o metabolismo dos peixes receptores. E sempre existe o risco de suspensão do fornecimento por surto de doenças e a possível veiculação de patógenos aos peixes receptores (Aizen et al., 2017; Boutier et al., 2015). Neste sentido, produtos sintéticos disponíveis comercialmente representam uma alternativa logística e biologicamente segura para substituir o EBHC.

Referências

- ABBAS, G.; KASPRZAK, R.; MALIK, A.; GHAFFAR, A.; FATIMA, A.; HAFEEZ-UR-REHMAN, M.; KAUSAR, R.; AYUB, S.; SHUAIB, N. Optimized spawning induction of blackfin sea bream, *Acanthopagrus berda* (Forsskål, 1775) in seawater ponds using Ovaprim hormone, with general remarks about embryonic and larval development. *Aquaculture*, v. 512, p. 734387, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734387>
- AIZEN, J.; HOLLANDER-COHEN, L.; SHPILMAN, M.; LEVAVI-SIVAN, B. Biologically active recombinant carp LH as a spawning-inducing agent for carp. *Journal of Endocrinology*, v. 232, n. 3, p. 391–402, 2017. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0435>
- ANDRADE, E. S.; CARVALHO, A. F. S.; FERREIRA, M. R.; PAULA, F. G.; RODRIGUES, F. S.; FELIZARDO, V. O.; REIS NETO, R. V.; MURGAS, L. D. S. Indutores hormonais na reprodução artificial de curimba (*Prochilodus lineatus*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 38, n. 4, p. 230–236, 2014. [http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n4/pag230-236%20\(RB519\).pdf](http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n4/pag230-236%20(RB519).pdf)
- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Baldisserotto, B.; Gomes, L. C. (Eds.). *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. Santa Maria, UFSM, 470 p. 2005. Pp. 175-193.
- AYA, B. E.; ARIAS, C. J. Reproducción inducida de *Pimelodus pictus* con extracto de hipófisis de carpa (EHC) y Ovaprim®. *Revista MVZ Cordoba*, v. 16, n.1, p.2317–2323, 2011. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682011000100007
- CAROLSFELD, J.; RAMOS, S. M.; ORMANEZI, R.; GOMES, J. H.; BARBOSA, J. M.; HARVEY, B. Analysis of protocols for application of an LHRH analog for induced final

maturation and ovulation of female pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887). *Aquaculture*, v. 74, n. 1–2, p. 49–55, 1988. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90085-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90085-3)

DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. A. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. Eds., *Fish Physiology*, v. 9, Academic Press, Orlando, FL. p. 351–403, 1983.

FELIZARDO, V. O.; MURGAS, L. D. S.; ANDRADE, E. S.; LÓPEZ, P. A.; FREITAS, R. T. F.; FERREIRA, M. R. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). *Theriogenology*, v. 77, n. 8, p. 1570–1574, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.025>

HILSDORF, A. W. S. et al. The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable production. *Reviews in Aquaculture*, v. 14, n. 2, p. 993–1027, 2022. <https://doi.org/10.1111/raq.12638>

HOSSAIN, M. B. et al. Comparative Study of Carp Pituitary Gland (PG) Extract and Synthetic Hormone Ovaprim Used in the Induced Breeding of Stinging Catfish, *Heteropneustes fossilis* (Siluriformes: Heteropneustidae). *Our Nature*, v. 10, n. 1, p. 89–95, 2013. <https://doi.org/10.3126/on.v10i1.7755>

IBGE. Tabela 3940: Produção da aquicultura, por tipo de produto Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA, 2021. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>> Acesso em 21 out.2022.

LEE, C. S.; TAMARU, C. S.; KELLEY, C. D. The cost and effectiveness of CPH, HCG and LHRH-a on the induced spawning of grey mullet, *Mugil cephalus*. *Aquaculture*, v. 73, n. 1–4, p. 341–347, 1988. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90067-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90067-1)

PADULA, A. M. GnRH analogues—agonists and antagonists. *Animal Reproduction Science*, v. 88, n. 1–2, p.115–126,2005. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.05.005>

PEIXE BR. Associação Brasileira da Piscicultura - Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixe BR, p. 140, 2022.

PEREIRA, T. S. B.; BOSCOLO, C. N. P.; MOREIRA, R. G.; BATLOUNI, S. R. The use of mGnRH α provokes ovulation but not viable embryos in *Leporinus macrocephalus*. *Aquaculture International*, v. 25, n. 2, p. 515–529, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0049-2>

PEREIRA, T. S. B.; BOSCOLO, C. N. P.; MOREIRA, R. G.; BATLOUNI, S. R. *Leporinus elongatus* induced spawning using carp pituitary extract or mammalian GnRH analogue combined with dopamine receptor antagonists. *Animal Reproduction*, v. 15, n. 1, p. 64–70, 2018. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-2017-AR983>

PETER, R. E.; YU, K. L. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: Basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 7, n. 2, p. 173–197, 1997. <https://doi.org/10.1023/A:1018431610220>

SHARAF, S. M. Effect of GnRHa, pimoziide and Ovaprim on ovulation and plasma sex steroid hormones in African catfish *Clarias gariepinus*. *Theriogenology*, v. 77, n. 8, p. 1709–1716, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.019>

WOYNÁROVICH, A.; VAN ANROOY, R. Field guide to the culture of tambaqui *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper vol. 624. Rome, FAO. 132 pp. 2019. <https://www.fao.org/3/ca2955en/CA2955EN.pdf>

ZANIBONI FILHO, E.; BARBOSA, D. C. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. *Revista Brasileira de Biologia*. v. 56, p. 655–659, 1996.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o constante dilema entre a preservação dos ecossistemas e ictiofauna das bacias hidrográficas, e a exploração humana dos recursos naturais para atender a demanda proteica da crescente população mundial, a aquicultura representa a principal solução. Por isso é uma das atividades do setor primário que mais cresce mundialmente. Entretanto, assim como em toda cadeia agropecuária, a criação de peixes de corte em cativeiro apresenta seus desafios e oportunidades de melhorias.

A produção comercial de tambaqui, principal espécie nativa na piscicultura nacional e em países vizinhos, se sustenta no uso de extrato hipofisário para a obtenção de juvenis. Os extratos hipofisários são eficientes para a reprodução da espécie em cultivo, no entanto, apresentam uma série de adversidades na sua utilização, as quais podemos destacar: despadronização de hormônios neles presentes; alta dependência de recurso natural; e risco de transmissão de patógenos, como, por exemplo, o herpes vírus CyHV-3. Por isso, seguindo uma tendência mundial, a piscicultura nativa brasileira necessita de estudos robustos acerca do uso de hormônios sintéticos substitutivos, que impulsionem a eficiência, reduzam os custos e garantam a oferta de formas jovens com máximo rendimento e economia.

Muito embora a reprodução seja muitas vezes a fase de produção menos valorizada, a manipulação reprodutiva é essencial para a manutenção de toda a cadeia produtiva de corte e também gera custos. Deste modo, o controle da reprodução em cativeiro através de protocolos hormonais, com eficiência, segurança biológica e também economia, é uma estratégia fundamental para fomentar e impactar a indústria de aquicultura no Brasil.

Esta tese traz contribuições importantes sobre os aspectos produtivos e fisiológicos relacionados à indução reprodutiva de *C. macropomum* baseada no uso de hormônios sintéticos disponíveis comercialmente. Os resultados apresentados neste trabalho elucidam aspectos da resposta fisiológica a estes produtos, contribuindo com novos conhecimentos sobre a biologia deste caracídeo neotropical, ao mesmo tempo em que fornece informações elementares aos profissionais de campo na escolha de produtos alternativos para a indução hormonal da espécie.

Nossos resultados indicam que os hormônios sintéticos testados são eficientes para induzir a maturação final e/ou desova na espécie, estimulando a produção de ovos em alta qualidade e quantidade. Da mesma forma, as respostas esteroidogênicas em todos os tratamentos foram fisiologicamente idênticas. Pela primeira vez, foi investigado os níveis

plasmáticos do progestágeno $17\alpha,20\beta$ -DHP em tambaquis sexualmente maduros, que acreditamos ser o esteroide indutor à maturação (MIS) da espécie, por sofrer uma ampla regulação positiva em resposta aos tratamentos com os indutores.

Neste estudo foram avaliadas a expressão dos genes *fsh β* e *lh β* em animais sexualmente maduros induzidos com a gonadorelina, que estimulou a expressão de *lh β* , fundamentando a eficiência deste hormônio no estímulo da maturação final, ovulação e espermição de tambaqui.

Por fim, analisando os custos dos hormônios sintéticos comerciais na produção de larvas de tambaqui, constatamos que o tratamento com o sGnRH (Ovaprim®), seguido da gonadorelina (Profertil®) foram os mais onerosos e que a buserelina (Sincroforte®) foi, amplamente, o que apresentou menor custo. O tratamento com extrato hipofisário de carpa apresentou respostas reprodutivas mais favoráveis, porém, diante da perspectiva de restrição da sua utilização em território nacional, pesquisas com diferentes dosagens de hormônios sintéticos alternativos podem aprimorar ainda mais os resultados de ovulação e desova.