



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

EFEITOS DA APLICAÇÃO DE IMPLANTES DE UM ANALOGO
DO LHRH ASSOCIADO À DOMPERIDONA NA MATURAÇÃO
GONADAL DO ROBALO-FLECHA (*Centropomus undecimalis*) EM
CATIVEIRO.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura do Centro
de Ciências Agrárias da Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre
em Aquicultura.

Orientador: Vinicius Ronzani Cerqueira

FELIPE SCHWAHOFER LANDUCI

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

L264e Landuci, Felipe Schwahofer
Efeitos da aplicação de implantes de um análogo do LHRH
associado à domperidona na maturação gonadal do robalo-flecha
(*Centropomus undecimalis*) em cativeiro [dissertação] / Felipe
Schwahofer Landuci ; orientador, Vinicius Ronzani Cerqueira. -
Florianópolis, SC, 2012.
87 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Robalo (Peixe). I. Cerqueira, Vinicius
Ronzani. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

CDU 639.3

**Efeitos da aplicação de implantes de um análogo do LHRH
associado à domperidona na maturação gonadal do robalo-flecha
(*Centropomus undecimalis*) em cativeiro**

Por

FELIPE SCHWAHOFFER LANDUCI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Vinícius Ronzani Cerqueira – *Orientador*

Dr. Eduardo de Medeiros Ferraz

Dr. Evoy Zaniboni Filho

Aos meus pais Luiz e Nancy, por conta do amor, carinho dedicação e
apoio nas decisões que me trouxeram até aqui.
À Marcella e o Bob pela compreensão e amor recebido, nos momentos
que antecederem esta etapa e nesses dois anos longe da família vivendo
em Florianópolis

Para sempre sou grato, obrigado.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, a todas as pessoas que tornaram este trabalho possível, principalmente minha família e em especial minha mãe e meu pai, a Marcella no apoio durante estes dois anos.

A Universidade Federal de Santa Catarina pelo ensino gratuito e de qualidade, onde pude me aperfeiçoar e apreender com grandes nomes em suas respectivas áreas. Agradeço também a todo o recurso locado pelo CNPq para cobrir os custos referentes a esta pesquisa e a CAPES pela bolsa de estudo.

Ao professor Vinicius Ronzani Cerqueira, pela amizade, atenção e possibilidade do aprendizado diário com um pesquisador referencia na piscicultura marinha, área que decidi seguir, sempre tendo com exemplo seus feitos e conquistas.

Ao professor Philip Conrad Scott um amigo e bom conselheiro, solícito e sempre “abrindo portas” quando precisei.

A professora Evelise M Nazari, professor Dib Ammar do laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, da Universidade Federal de Santa Catarina, que aceitaram o desafio de me auxiliar nas análises histológicas, mesmo com todas as dificuldades inerentes ao processo.

Ao José Luiz Pedreira Mourião do LCM, por conta das suas boas idéias e generosidade em ceder o uso dos equipamentos necessários. Ao professor Afonso Bainsy e sua equipe pela atenção e disponibilidade de suas instalações para as análises de enzima imuno-ensaio.

Aos amigos do LAPMAR. Desde a construção dos tanques até as análises bioquímicas, sozinho eu nada faria. Tenho certeza que levo grandes amigos para a vida.

Ao Vaico, Israel, Sayão e a Salete pelos momentos divertidos passados, que sem duvidas tornaram, os momentos mais difíceis se tornarem mais leves de serem encarados.

Ao Guilherme O. Zimmermann pela confiança e credito em ceder os peixes, entre elas a “Salete”, a primeira robalo-flecha a maturar e desovar em condições de cativeiro no Brasil.

RESUMO

Para obtenção de larvas do robalo-flecha, *C. undecimalis* em laboratório, a maturação dos reprodutores é um processo fundamental. Desta forma pretende-se avaliar o efeito na gametogênese, de implantes Etileno Vinil Acetato, contendo um analogo do hormônio LHRH e um antagonista de dopamina (Domperidona). Foram utilizados 18 peixes marcados com microchip, mantidos em um tanque circular de 36 m³ com controle de temperatura e fotoperíodo em sistema de recirculação. Foram realizados dois tratamentos em duplicata: implantes contendo 100 µg de LHRH + 5 mg de DOM kg⁻¹; implantes contendo 100 µg de LHRH kg⁻¹ e tratamento controle com implante sem hormônio. A temperatura foi mantida em 27 °C e após os implantes sofreu um acréscimo de 0,1 °C a cada 24 h, até atingir 29 °C. A salinidade foi mantida em 35‰. Foram realizadas biopsias ovarianas em fêmeas e massagem abdominal em machos, no momento do implante e também após um período de vinte dias e cinquenta dias. Em conjunto foram tomadas amostras de sangue para análise de eritrócitos e esteróides sexuais. Os resultados indicam que não há controle da dopamina no processo de maturação sexual. Para fêmeas o implante agiu como um acelerador da maturação, sem entanto agir como um iniciador da vitelogênese. Para machos não foram notadas melhorias nos aspectos volume de sêmen, motilidade do sêmen e tempo de motilidade do sêmen em funções dos tratamentos. Os valores plasmáticos do esteroide estradiol corroboram com a classificação sexual através da histologia. A liberação contínua e prolongada por parte do implante EVAc não foi capaz de suprir o estímulo inicial necessário para a desova, demonstrando ser necessário, para este tipo de implante, doses maiores.

Palavras-chave: *C.undecimalis*, Domperidona, GnRH, maturação sexual, EVAc, implantes de liberação controlada

ABSTRACT

To obtain common snook (*Centropomus undecimalis*) fingerlings in laboratory, the gonadal maturation is a fundamental process. In this way is intended to evaluate the effects on gametogenesis of EVAC implants containing a gonadotrofin-hormone release analogue (LHRH-a) and a dopamine inhibitor (Domperidone). Were used eighteen fish, identified with microchip, kept in circular tanks of 36m³ volumes with controlled temperature and natural photoperiod in recirculation system. Was done two treatments in duplicate: implants with 100µg/Kg of LHRH-a and 5mg /Kg of domperidone, implants containing only 100µg/Kg of LHRH-a and a control treatment with unloaded implants. The temperature was kept in 27°C and after implants was increased 0.1°C each hour until 29°C pike. Salinity was maintained at 35‰. Were made ovarian biopsies in females and abdominal massage in males at the implant moment, twenty and fifty days later. Together were taken blood samples for steroids and red blood cells analysis. The results indicate that there's no dopamine control in gonadal maturation process. For females the implant acted as accelerator but not as a initiator of gonadal maturation. To males was not noticed any improvement in semen volume, semen motility and motility time of semen by the treatments. The plasmatic values of steroids and histological analysis corroborated to determine the gonadal maturation class. The continuous and prorogated liberation by the EVAc implant was not able to satisfy the necessary stimuli for spawning, demonstrating that is necessary high doses for this type of sustained release implant.

PROPOSTA DA DISSERTAÇÃO

Este trabalho se origina de uma demanda do Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR), de aprimorar técnicas de maturação em laboratório para o robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, visando a reprodução em cativeiro e conseqüente melhoria na produção de larvas e alevinos. O fato é que em condições de laboratório, a outra espécie de robalo mantida no LAPMAR, o robalo-peva, *Centropomus parallelus* atinge a maturação com certa facilidade, o mesmo não se observa para o robalo-flecha. Desta maneira, imagina-se que a espécie presente alguma falha no processo reprodutivo em cativeiro, e que a solução para o problema esteja em encontrar os possíveis fatores físico-químicos (temperatura da água, fotoperíodo, etc) ou biológicos (aspectos nutritivos, ou de falhas no sistema endócrino) que possam solucionar os baixos desempenhos de maturação da espécie, atualmente observados no laboratório.

Dentro deste contexto, levantou-se dentre a bibliografia existente até o momento, informações que pudessem dar subsídios para o desenvolvimento do trabalho, e dessa maneira partiu-se de critérios mais simples como a utilização de variação de temperatura e simulação de luz, até fatores mais específicos do controle endócrino, através de manipulações hormonais, buscando se um melhor entendimento dos processos que levam à maturação sexual em cativeiro e conseqüente desova.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Robalo-flecha (<i>Centropomus undecimalis</i>)	25
Figura 2. Representação esquemática do eixo reprodutivo nos peixes. 28	
Figura 3. Canal de adução da Fazenda Ilha das Palmas, onde foram capturados alguns dos reprodutores utilizados neste estudo	68
Figura 4. Nova sala de maturação de reprodutores	68
Figura 5. Tanque de 36m ³ utilizados no experimento	69
Figura 6. Incisão intraperitoneal para colocação do implante	69
Figura 7. Colocação do implante na incisão intraperitoneal, com auxílio de pinça.	70
Figura 8. Esquema da contagem de eritrócitos na câmara de Neubauer	70
Figura 9. Contagem e mensuração dos ovócitos. Fêmea 52443 em T=20.	71
Figura 10. Contagem e mensuração dos ovócitos. Fêmea 46767 em T=20.	71
Figura 11. Contagem e mensuração dos ovócitos. Fêmea 46268 em T=20.	72
Figura 12. Contagem e mensuração dos ovócitos. Fêmea 58012 em T=20.	72
Figura 13. Análise histológica de biopsia ovariana. Fêmea 52443 em T=0. Aumento 100X. Barra indica 100um.....	73
Figura 14. Análise histológica de biopsia ovariana. Fêmea 52443 em T=20. Aumento 100X. Barra indica 100um.....	73
Figura 15. Análise histológica de biopsia ovariana. Fêmea 46767 em T=20. Aumento 100X. Barra indica 100um.....	74
Figura 16. Análise histológica de biopsia ovariana. Fêmea 46268 em T=0. Aumento 100X. Barra indica 150um.....	74
Figura 17. Análise histológica de biopsia ovariana. Fêmea 46268 em T=20. Aumento 100X. Barra indica 150um.....	75
Figura 18. Análise histológica de biopsia ovariana. Fêmea 58012 em T=0. Aumento 100X. Barra indica 150um.....	75
Figura 19. Análise histológica de biopsia ovariana. Fêmea 48916 em T=0. Aumento 100X. Barra indica 150um.....	76
Figura 20. Análise histológica de biopsia ovariana. Fêmea 57905 em T=0. Aumento 100X. Barra indica 150um.....	76
Figura 21. Análise histológica de biopsia em macho. Aumento 100X. Barra indica 15 0um.	77

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Total number of erythrocytes X 10⁶ / mL.. Different letters mean statistical difference.....54

Fig. 2. Sexual maturation throughout the experiment. a- Number of mature males off each sample time ; b-oocyte development, IID: means idoneuos induction diameter54

Fig. 3. Quantitative and qualitative aspects of semen collected at the end of experiment. a- Semen volume; b- Motility time. Different letters mean statistical difference.55

Fig. 4 Mean diameter of total oocytes. a- Treatment GnRH female; b- Treatment GnRH + DOM female. Different letters mean statistical difference.55

Fig. 5. Mean diameter of total oocytes. a- Treatment Blank female; b- Treatment GnRH female. Different letters mean statistical difference.56

Fig. 6. Frequency of oocytes in treatment Blank female. a- T₀; b- T₂₀; c- T₅₀56

Fig. 7. Frequency of oocytes in treatment GnRH female. a- T₀; b- T₂₀; c- T₅₀57

Fig. 8. Frequency of oocytes in treatment GnRH + DOM female 1. a- T₀; b- T₂₀; c- T₅₀.....57

Fig. 9. Gonadal histological analysis of Blank treatment female. a- sample time T₀; b- sample time T₂₀ Magnification 100X. Bar indicates 100 μm58

Fig. 10. Gonadal histological analysis of GnRH treatment female. a- sample time T₀; b- sample time T₂₀ Magnification 100X. Bar indicates 100 μm58

Fig. 11. Gonadal histological analysis of GnRH+DOM treatment female 1. a- sample time T₀; b- sample time T₂₀ Magnification 100X. Bar indicates 150 μm59

Fig. 12. Gonadal histological analysis of two fish, characterized as female throught experiment. a- sample time T₀ of blank treatment fish; b- sample time T₀ of GnRH treatment fish. SPG = Spermatogonia. Magnification 100X. Bar indicates 150.....59

INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Experimental Design	78
Tabela 2. Reproductive estate, gametes and erythrocytes number in T=0	79
Tabela 3. Reproductive estate, gametes and erythrocytes number in T=20	80
Tabela 4. Reproductive estate, gametes and erythrocytes number in T=50	81
Tabela 5. Qualitative and quantitative analysis of the semen at the end of experiment.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LAPMAR	Laboratório de Piscicultura marinha
Anova	Análise de variância
Dp	Desvio padrão
$\alpha = 0,05$	Nível de significância de 0,5 por cento
\pm	Mais ou menos
%	Partes por cem (percentagem)
h e hs	Hora e horas
‰	Partes por mil
Mm	Micrômetros
Mm	Milímetros
Cm	Centímetros
M	Metro
μL	Microlitro
mL	Mililitro
L	Litro
Mg	Miligramas
$\mu\text{g kg}$	Microgramas por quilo
kg m^{-3}	Quilograma por metro cúbico
W	Watts
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
17α MT	17α metiltestosterona
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
E_2	Estradiol
T	Testosterona
11-CT	11 cetotestosterona
DA	Dopamina
DOM	Domperidona
PIM	Pimozida
LHRHa	Análogo do hormônio Liberador do hormônio Luteinizante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
GnRHs	Hormônio Liberador de Gonadotrofina de salmão
EVac	Etileno Vinil-acetato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	23
1.1 Apresentação e problemática.	23
1.2 Caracterização da espécie.	24
1.2.1 Classificação	25
1.2.2 Esforços para produção em cativeiro	25
1.3 A maturação gonadal em cativeiro.....	26
1.3.1 O efeito da utilização de agentes hormonais sobre a maturação gonadal	27
1.3.2 Sistemas de liberação sustentada de hormônio.	29
1.3.3 Inibidor de Dopamina	30
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	32
EFEITOS DA APLICAÇÃO DE IMPLANTES DE UM ANALOGO DE LHRH ASSOCIADO À DOMPERIDONA NA MATURAÇÃO GONADAL DO ROBALO-FLECHA (<i>Centropomus undecimalis</i>) EM CATIVEIRO	33
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS	37
Animais utilizados e seu histórico	37
Desenho experimental.....	37
Amostras	38
Confecção dos implantes de hormônio	39
Análise estatística	40
RESULTADOS.....	40
Análises dos gametas.	40
Caracterizações histológicas dos ovócitos.	41
Análise de esteroides e eritrócitos.....	42
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	47
AGRADECIMENTOS.....	47
LITERATURA CITADA	48
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
BIBLIOGRAFIA GERAL	62
ANEXOS.....	68

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Apresentação e problemática.

Um aspecto importante para o desenvolvimento da piscicultura marinha é a melhoria de programas de controle dos processos reprodutivos de peixes em cativeiro. A chave para o desenvolvimento das atuais e futuras tecnologias de desova é o entendimento do efeito do confinamento sobre o sistema endócrino dos peixes (ZOHAR; MYLONAS, 2001). Desta forma, a escolha de uma espécie para o cultivo depende de obter-se o maior número de informações biológicas relacionadas, principalmente, a características sexuais, como capacidade de maturar em cativeiro e da necessidade de intervenção hormonal para obtenção de gametas. Exemplo disso pode ser visto como no ocorrido na produção do barramundi, *Lates calcarifer*, na Tailândia, onde até bem pouco tempo, as coletas de alevinos eram feitas diretamente do ambiente com capturas anuais, entretanto, a redução dos estoques naturais desta espécie de robalo obrigou o desenvolvimento de técnicas de reprodução controlada em cativeiro (ALVAREZ-LAJONCHÈRE, 2004; ALVAREZ-LAJONCHÈRE; TSUZUKI, 2008).

No Brasil, as espécies de robalos que mostram potencial para avanço da piscicultura marinha, dada a qualidade da carne, valor econômico e potencial para a pesca esportiva, são o robalo-peva (“fat snook”), *Centropomus parallelus* e o robalo-flecha (“common snook”), *Centropomus undecimalis*.

Em relação ao robalo-peva, trabalhos no Brasil com a maturação em cativeiro, desova e larvicultura apresentaram resultados satisfatórios para o cultivo em larga escala (ALVAREZ LAJONCHÈRE et al., 2002; CERQUEIRA, 2002, FERRAZ 2002; CERQUEIRA e TSUZUKI, 2009, CERQUEIRA, 2009). Em relação ao robalo-flecha, a situação é bem mais complexa, visto que a espécie apresenta em condições de cativeiro sérios problemas para atingir maturação gonadal principalmente em relação às fêmeas (CERQUEIRA, 2009). Soligo et al. (2008) obtiveram reprodução induzida para a espécie pela primeira vez no Brasil, no ano de 2006 com desova obtida a partir de reprodutores fêmeas selvagens recém-capturados e de machos criados em cativeiro desde alevinos. Os gametas foram obtidos 36 h após aplicação do hormônio LHRHa, mas obteve-se limitada porcentagem de fertilização, devido ao pequeno volume de sêmen coletado. Deixando claro que no momento, não havia situação adequada para maturação e conseqüentemente para a produção de sêmen. SANCHEZ-ZAMORA (2009) relata que estudos realizados

no México levaram à formulação de algumas hipóteses para os fatores principais que podem favorecer a maturação da espécie em cativeiro: o fotoperíodo, o emprego de indutores hormonais, a qualidade da dieta e a salinidade, mas o importante seria definir aquele que realmente pode ser decisivo para a sua maturação.

Em resumo, a maturação plena para o robalo-flecha em cativeiro dependerá de uma revisão ampla do maior número possível de informações dos processos de manutenção dos animais.

1.2. Caracterização da espécie.

O robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* (figura 1) é uma espécie diádroma, estenotérmica, eurialina, dependente do estuário, encontrada no Oceano Atlântico tropical e subtropical, da latitude 34° N até 25° S. Na Flórida, os manguezais da linha costeira são o seu principal habitat (TAYLOR et al., 1998). A maturação da fêmea e a desova começam em abril, quando o Índice gonadossomático (IGS) ultrapassa 1.0 e o diâmetro máximo do ovócito ultrapassa 470 µm. Possuem desenvolvimento sincrônico em mais de dois grupos de ovócitos e desovam múltiplas vezes durante um período de 6 a 7 meses nos Estados Unidos (TAYLOR et al., 1998; PETERS et al., 1998; TAYLOR et al., 2000).

No caso dos machos, o início do período da maturação é fevereiro e se estende até junho e a maturação plena ocorre de maio a outubro. Seu testículo é lobular e consiste de compartimentos germinativos que terminam na periferia do próprio testículo (GRIER; TAYLOR, 1998). Pesquisas com a biologia da espécie estão sendo feitas desde os anos de 1950 nos Estados Unidos (VOLPE, 1959), com objetivo de repovoamento de estoques na costa da Flórida.

No Brasil, relatos preliminares sobre ciclo de atividade sexual de *C. undecimalis* foram descritos por Costa et al. (1981).



Figura 1: Robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*)

1.2.1 Classificação

Robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*.

Classe: Osteichthyes

Sub-classe: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Subordem: Percoidei

Família: Centropomidae

Gênero: *Centropomus*

Espécie: *Centropomus undecimalis* (BLOCH, 1792)

1.2.2 Esforços para produção em cativeiro

Com a preocupação da redução dos estoques da espécie no ambiente natural, vários pesquisadores deram início nos Estados Unidos a pesquisas com a reprodução da espécie, baseados na captura de animais selvagens e maduros. Experimentos foram realizados com o emprego do hormônio gonadotrófico coriônico humano (HCG) (AGER, 1976; EDWARDS; HENDERSON, 1985; ROBERTS et al., 1988; WALLACE et al., 1993; NEIDIG et al., 1999). Posteriormente com a utilização do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (SKAPURA et al., 1999; NEIDIG et al, 2001). Atualmente partes dos esforços concentram-se na obtenção de desovas sem o emprego de hormônios, através da captura de animais em pleno momento de liberação dos gametas, sua extrusão é feita no campo e os ovos transferidos para laboratório para início da larvicultura (YANES-ROCA, 2006). Os

resultados são positivos, mas não necessariamente representam a solução para empreendimentos comerciais.

No Brasil, Soligo et al. (2008) obtiveram reprodução induzida para a espécie pelo emprego do hormônio LHRHa e utilização de fêmeas selvagens, maduras, capturadas no seu período reprodutivo e machos que maturaram em cativeiro. Trabalhos com a reprodução da espécie também estão sendo conduzidos no México, através do emprego do hormônio LHRHa (SANCHEZ-ZAMORA, 2009). Recentemente Ferraz (2009) utilizou implantes silásticos de LHRH + 17 α -MT e manipulações de fotoperíodo e temperatura para atingir a maturação em cativeiro, e o que se verificou foi um aumento no volume de sêmen, sendo maior nos machos tratados com a mistura de hormônios, se comparados ao tratamento sem hormônio e somente com 17 α -MT.

1.3. A maturação gonadal em cativeiro.

O entendimento do processo de maturação gonadal e as formas para a sua regulação endócrina passam a ser decisivos quando se procura a adaptação de uma espécie para o cultivo em cativeiro. De acordo com PATIÑO E SULLIVAN (2002), a maturação gonadal em fêmeas (ovogênese) é o processo pelo qual as células germinativas primordiais (CGPs) tornam-se ovócitos prontos para serem fertilizados.

Neste processo são envolvidos estímulos ambientais como o fotoperíodo e temperatura buscando adiantar, atrasar e sincronizar a maturação e desova para várias espécies de clima frio e temperado (BROMAGE et al 2001; BOUEF; LE BAIL, 1999) e apesar de não estar claro como estes efeitos desencadeiam o processo, desempenham um papel importante (PANKHURST; POTER, 2003).

Nesta mesma linha, a condição nutricional é pré-requisito para reprodutores em cativeiro. Desta maneira o alimento ofertado e a frequência de alimentação, devem estar baseados em dietas completas, ricas em ácidos graxos e com boa atratividade (FERRAZ, 2009). No México, SANCHES et al. (2002) relatam sucesso na obtenção de exemplares maduros do robalo-flecha alimentados com uma dieta à base de peixe congelado e suplementada com óleo de peixe. Já em Cuba, para essa mesma espécie, REYES et al. (2004) e FRAGA et al. (2006) testaram rações úmidas com peixe, lula e adição de farinha de peixe, sendo observados bons resultados para o fator de condição quando uma frequência alimentar de três vezes na semana foi aplicada em comparação à alimentação diária.

1.3.1. O efeito da utilização de agentes hormonais sobre a maturação gonadal

Segundo MYLONAS & ZOHAR (2001) independente de um bom estado nutricional, a maioria das fêmeas, em confinamento, fica presa a estágios avançados de vitelogênese seguidos pela atresia folicular, e machos apresentam quantidades limitadas de sêmen e de baixa qualidade. Os animais não encontram todos os gatilhos ambientais necessários (migração reprodutiva e áreas de desova adequada) de maneira que ocorra a maturação final dos ovócitos, ovulação e consequente processo de desova, apresentando disfunções reprodutivas similarmente a muitos animais silvestres mantidos em cativeiro. Para aqueles autores, problemas reprodutivos são normalmente mais sérios em reprodutores femininos. O processo de maturação sexual pode ser entendido de maneira simplificada de acordo com a figura 2 ou como o proposto por YARON & SIVAN (2006): “O GnRH produzido no hipotálamo estimula a produção do hormônio folículo estimulante (FSH), este por sua vez promove a secreção de estradiol 17β que induz a produção de vitelogenina e coriongenina. Estas são transportadas via corrente sanguínea e utilizadas pelo folículo sobre regulação do FSH e incorporadas no ovócito para formação dos grânulos de vitelo e o córion. Na sequência, GnRH estimula a liberação do hormônio luteinizante (LH). O folículo do ovário vitelogênico responde secretando o hormônio indutor da maturação final do ovócito (MIS) ou $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP), formando o fator indutor da maturação final (MPF)”.

Esta mesma informação é bastante limitada no caso da espermatogênese. SCHULZ et al. (2001) comentam que as gonadotrofinas hipofisárias, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) regulam a esteroidogênese e a espermatogênese pela ativação de receptores das células de Leydig (receptor LH) e pelas células de Sertoli (receptor de FSH), respectivamente. SCHULZ & MIURA (2002) sugerem que o FSH é o mais importante hormônio que regula a esteroidogênese de peixes, sendo que aumento de FSH pode ser suficiente para iniciar a espermatogênese pela ativação das células de Sertoli e a produção de 11-Ketotestosterona (11KT). Outro importante andrógeno é a testosterona (T) e parece existir um correto balanço na proporção de T e 11KT produzidas. A resposta dos andrógenos sobre gonadotrofinas apresenta um complexo padrão.

De acordo com DONALDSON & HUNTER (1983), desde 1975 para a indução a desova de peixes vem sendo utilizada com sucesso a utilização dos hormônios liberadores de gonadotropinas (GnRH), que apresentam algumas vantagens como atuar no início da cadeia hormonal e estimular o peixe a sintetizar a sua própria gonadotrofina, eliminando assim os problemas relacionados a utilização de gonadotrofina de outras espécies.

ZANIBONI-FILHO & WEINGARTNER (2007) afirmam que esses hormônios são muito semelhantes entre os vertebrados superiores e inferiores, havendo pequenas alterações na estrutura molecular do decapeptídeo e que apesar da existência de vários análogos no mercado ou formas sintéticas bem mais potentes, os mais utilizados para indução à maturação final de peixes são os análogos dos hormônios liberadores de gonadotropina (GnRH-a) de mamíferos e de salmão.

Neste trabalho a forma de apresentar esses dois análogos, seguirá a terminologia proposta por HARVEY & CAROLSFELD (1993), que sugerem [D-Ala6, Pro9 NET] LHRH para o de mamífero e [D-Arg6, Pro9 NET] sGnRH para o análogo de salmão.

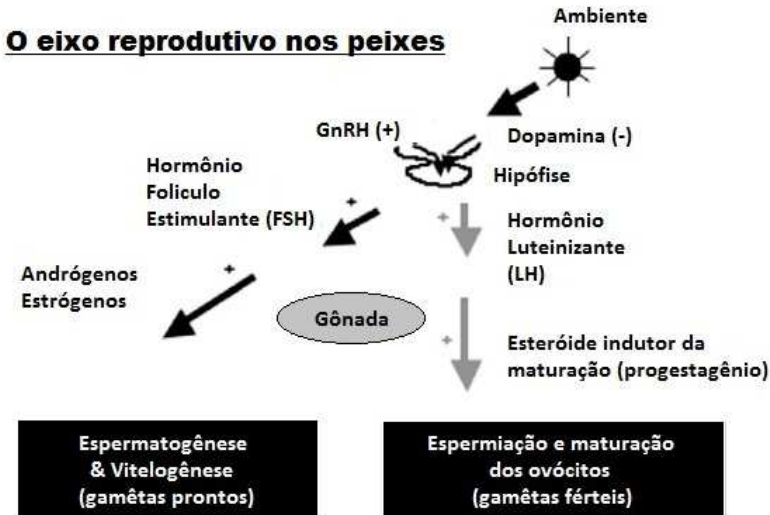


Figura 2. Representação esquemática do eixo reprodutivo nos peixes.

1.3.2 Sistemas de liberação sustentada de hormônio.

A necessidade do desenvolvimento de uma formulação hormonal que não exigisse aplicações repetidas foi reconhecida no início do desenvolvimento de terapias de indução de desova (FONTENELE, 1955). Mais tarde, foi constatado que GnRH emulsificado foi mais eficiente na indução do yellowfin goby *Acanthogobius flavimanus*, embora a cinética da liberação de GnRH não tenha sido avaliada. O maior sucesso da preparação foi atribuído à liberação de GnRH prolongada da emulsão (MYLONAS & ZOHAR, 2001). Após a demonstração de uma liberação sustentada de GnRH a partir de uma matriz de colesterol em mamíferos (KENT et al., 1980), estudos foram realizados com peixes e indicaram que o tratamento de GnRH com um sistema de liberação (“delivery system”) foi muito mais eficaz na promoção de maturação gonadal, e indução da ovulação e espermição em comparação com uma única injeção de GnRH dissolvido em solução salina. (MYLONAS & ZOHAR, 2001)

Neste tipo de implante o GnRH é liberado em um processo de difusão controlada e entre os inúmeros tipos de implantes vem se destacando o do tipo copolímero de Etileno vinil acetato (EVAc) que pode ser fabricado na forma de micro esferas ou implantes flexíveis. O implante EVAc é preparado por adição do polímero dissolvido em solvente e uma mistura de inulina, albumina do soro bovino e a quantidade adequada de GnRH em pó. O solvente é evaporado, resultando uma matriz solidificada esponjosa contendo o polímero, a mistura inulina / Albumina do soro bovino (BSA) e GnRH. (SALTZMAN, 2001)

Normalmente os implantes EVAc são cilindros de 2 ou 3 mm de diâmetro, podendo conter de 50-250 µg de GnRH. Neste tipo de implante a mistura inulina / BSA age como agente de volume, criando canais no meio do polímero solidificado. Após a aplicação o contato com os fluidos corporais vai dissolvendo lentamente a mistura e liberando o GnRH preso. (SALTZMAN, 2001)

O período de liberação pode variar entre 2-5 semanas dependendo do formato, da mistura e da área de contato da superfície do implante. Sua fabricação é simples, podendo ser feitos de 200 a 500 implantes de uma vez, minimizando custos e variação de GnRH em cada implante. Sua aplicação é simples e não causa danos aos peixes, além de ter a vantagem de poder ser estocado em -20°C durante até 3 anos. (MYLONAS & ZOHAR, 2001)

Experimentos estão sendo realizados para várias espécies de peixes baseados em sistemas de liberação prolongada, associando o uso de GnRH com esteróides sexuais como a 17 α metiltestosterona (MT), testosterona (T) 11 Cetotestosterona (11-CT), Domperidona (DOM) e Pimozida (PIM) (REPROD-DOTT , 2011; MYLONAS 2004; MARINO et al, 2003; IBARRA-CASTRO 2007; LEE et al., 1986a; LEE et al., 1986b, TAMARU et al., 1988; TAMARU et al., 1989; MCGUREN et al 2005; HOLLAND, 2002; ZANUY et al, 1999; VIDAL et al, 2004).

1.3.3. Inibidor de Dopamina

Em muitos teleósteos, a dopamina (DA) exerce um controle inibitório direto, neutralizando o efeito do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Este duplo controle de GnRH e DA tem sido demonstrado em vários teleósteos adultos e tem implicações importantes para a aquicultura. A plasticidade da dopamina no papel neuroendócrino pode ter contribuído para a sua grande diversidade de ciclos biológicos e a sua boa adaptação a diversos ambientes (DUFOUR et al 2005). Segundo BROMAGE & ROBERTS (1995) em peixes marinhos, a ação da dopamina, na retirada do GnRH de circulação é pequena e conseqüentemente o emprego de somente GnRH é bastante efetivo na liberação das gonadotrofinas. No entanto, AIZEN et al (2005) observaram melhores resultados para ovulação e desova da tainha (*Mugil cephalus*) com a utilização da aplicação do hormônio GnRH associado ao uso do agente anti-dopaminérgico “domperidona”, quando comparado à aplicação apenas do GnRH. Já VIDAL et al. (2004) verificaram o mesmo para *Anguilla Anguilla*, constatando que na pré-puberdade, remoção da inibição da dopamina (DA) é exigida, provocando a síntese de GnRH e a liberação do FSH e assim iniciando o desenvolvimento ovariano, sendo a primeira demonstração de um papel essencial da DA no controle do FSH e da puberdade em um teleósteo juvenil. No mussum *Synbranchus marmoratus* um peixe hermafrodita protogínico, a Domperidona (DOM) associada com um GnRHs, não induziu a ovulação, contudo fez machos espermiarem em 3 semanas e mostrou evidências de ter atuado na reversão sexual. (RAVAGLIA et al 1997).

De qualquer maneira, fica claro que na maioria das espécies cultivadas em cativeiro, o principal bloqueio está relacionado ao estímulo final para maturação final de ovócitos, até a expulsão do óvulo pelo folículo. No caso de machos no aumento de volume de sêmen e

plasma seminal. O desenvolvimento de protocolos hormonais complexos como o uso de várias aplicações ou sistemas de ação prolongada, associados ou não a esteróides sexuais pode em alguns casos ser a única via possível para o término da vitelogênese e espermatogênese em animais com bloqueio da maturação.

2. JUSTIFICATIVA

Para que o cultivo de peixes marinhos se desenvolva no Brasil, como também em todo lugar é fundamental que haja disponibilidade de “sementes”, ou seja, alevinos para ser engordados e comercializados (ANDRADE & YASUI, 2003). O robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) é uma espécie com grande potencial para piscicultura marinha, entretanto para a obtenção de formas jovens, ainda se depende de questões ligadas a sazonalidade, necessitando de mais conhecimento acerca da problemática relacionada à maturação sexual de reprodutores em cativeiro, devido as dificuldades já observadas em alguns locais, tanto para machos quanto para fêmeas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O Trabalho tem como objetivo, auxiliar na compreensão dos problemas relacionados à maturação gonadal gerando tecnologias que auxiliem na produção de larvas do robalo-flecha em cativeiro.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a eficácia de um análogo do LHRH associado a domperidona na maturação gonadal, tanto em machos quanto em fêmeas do robalo-flecha.
- Analisar o efeito da dose de 100 µg/Kg para fêmeas e 50 µg/Kg para machos de LHRHa e dose de 100 µg/Kg para fêmeas e 50 µg/Kg para machos de LHRHa 5 mg/Kg de Domperidona tanto para fêmeas quanto para machos na cascata hormonal do robalo-flecha.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

EFEITOS DE IMPLANTES DE UM ANALOGO DE LHRH ASSOCIADO À DOMPERIDONA NA MATURAÇÃO GONADAL DO ROBALO-FLECHA (*Centropomus undecimalis*) EM CATIVEIRO.

Revista: Modelo usado Neotropical Ichthyology

EFEITOS DA APLICAÇÃO DE IMPLANTES DE UM ANALOGO DE LHRH ASSOCIADO À DOMPERIDONA NA MATURAÇÃO GONADAL DO ROBALO-FLECHA (*Centropomus undecimalis*) EM CATIVEIRO.

Felipe Schwahofer LANDUCI ^{1*}; Gabriel PASSINI ¹; Fabio Carneiro STERZELECKI ²; Cristina Vaz de Avelar CARVALHO ³; Ricardo Shinji TAKEUCHI ¹; Vinicius Ronzani CERQUEIRA ⁴

¹Aluno de Mestrado em Aquicultura –UFSC; ² Mestre em Biologia Celular e Molecular – UFPR ; ³ Aluna de Doutorado em Aquicultura – UFSC; ⁴ Professor Titular, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias - UFSC

* Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Dep. de Aquicultura, Lab. de Piscicultura Marinha, CP 476, CEP 88040-970 Florianópolis, SC. E-mail: felipeslanduci@hotmail.com

RESUMO

A maturação em cativeiro é um processo importante para se obter a reprodução induzida de peixes, mas no caso do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* ainda existem dificuldades para que isto seja feito rotineiramente. Desta forma pretende-se avaliar o efeito na gametogênese, de implantes de Etileno Vinil Acetato, contendo um analogo do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRHa) e um antagonista de Dopamina (Domperidona, DOM). Foram utilizados 18 peixes marcados com microchip, mantidos em um tanque circular de 36 m³ com controle de temperatura e fotoperíodo, em sistema de recirculação. Foram realizados dois tratamentos em duplicata: implantes contendo 100 µg de LHRH + 5 mg de DOM kg⁻¹; implantes contendo 100 µg de LHRH kg⁻¹ e tratamento controle com implante sem hormônio. A temperatura da água era de 27 °C e após os implantes sofreu um acréscimo de 0,1 °C a cada 24 h, até atingir 29 °C. A salinidade foi mantida em 35‰. Foram realizadas biópsias ovarianas em fêmeas e massagem abdominal em machos, no momento do implante e, também, após um período de vinte e cinquenta dias. Em conjunto foram tomadas amostras de sangue para análise de eritrócitos e esteróides sexuais. Os resultados indicam que não houve controle da dopamina no processo de maturação nas primeiras fases da vitelogênese. Para fêmeas o implante agiu como um acelerador da maturação, sem entanto agir como um iniciador do processo. Para machos não foram notadas variações no volume, motilidade e tempo de motilidade do sêmen em função dos tratamentos.

ABSTRACT

The first step of gametogenesis called initial maturation is an important process to obtain induced spawning of fish, but in common snook (*Centropomus undecimalis*) case, difficulties still exist to this be done routinely. This study intends to evaluate the effect of Ethylene Vinyl Acetate (EVAc) implants containing an analog of luteinizing hormone releasing-hormone (LHRHa) and a dopamine antagonist (Domperidone, DOM) on initial maturation of common snook. Have been used 18 fish marked with microchip, kept in a circular tank of 36m³ with controlled temperature and photoperiod, in a recirculating system. Two treatments were performed in duplicate: implants containing 100 µg of LHRHa + 5 mg of Dom per Kg of fish; implants containing 100 µg of LHRHa per kilogram of fish and a control treatment with implant without hormone.

The water temperature was 26°C and after the implants has increased by 0.1 °C every 24 h reaching 29 °C. Salinity was maintained at 35‰. Ovarian biopsies were performed in female and abdominal massage to males at the implant moment and also after a period of twenty and fifty days. Together blood samples were taken for analysis of erythrocytes and sex steroids. The results indicate that there no control of dopamine in the maturation process in the early stages of vitellogenesis. In females the implants acted as an accelerator of the process, but not as an initiator. For males were not noticed changes in sperm volume, motility and motility duration.

INTRODUÇÃO

No Brasil, as espécies de robalos que mostram potencial para avanço da piscicultura marinha, dada a qualidade da carne, valor econômico e potencial para a pesca esportiva, são o robalo-peva (“fat snook”), *Centropomus parallelus* e o robalo-flecha (“common snook”), *Centropomus undecimalis* (Cerqueira & Tsuzuki, 2009).

Em relação ao robalo-peva, trabalhos com a maturação em cativeiro, desova e larvicultura apresentaram resultados satisfatórios para o cultivo em larga escala (Alvarez- Lajochère *et al.*, 2002; Cerqueira, 2002, Ferraz *et al*, 2002; Cerqueira & Tsuzuki, 2009). Já em relação ao robalo-flecha, a espécie apresentou, em condições de cativeiro, sérios problemas para atingir maturação gonadal principalmente em relação às fêmeas em testes realizados no Brasil (Soligo *et al*, 2008; Ferraz e Cerqueira, 2011), sobretudo devido a dificuldade na manutenção e captura de animais, geralmente pelo elevado tamanho, mas também devido a sua condição de hermafrodita protândrico.

O controle da reprodução em cativeiro é um processo fundamental para a sustentabilidade da aqüicultura comercial, e o ciclo reprodutivo dos peixes é separado em duas fases: crescimento (gametogênese) e maturação (maturação do ovócito e espermição), ambos controlados por hormônios reprodutivos do cérebro, pituitária e gônadas (Mylonas *et al* 2010).

Segundo Zohar & Mylonas (2001), independente de um bom estado nutricional, a maioria das fêmeas em confinamento, fica presa a estágios avançados de vitelogênese seguidos pela atresia folicular, e machos apresentam quantidades limitadas de sêmen e de baixa qualidade.

Os animais não encontram todos os gatilhos ambientais necessários (migração reprodutiva e áreas de desova adequadas), de maneira que ocorra a maturação final dos ovócitos, ovulação e desova para fêmeas, levando à necessidade da utilização de tratamentos hormonais, sobretudo com a utilização do hormônio GnRH e seus análogos (Mylonas *et al* 2010).

Em muitos teleósteos, a dopamina (DA) exerce um controle inibitório direto, neutralizando o efeito do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Em peixes marinhos, a ação da dopamina na retirada do GnRH de circulação é pequena, e conseqüentemente o emprego somente de GnRH é bastante efetivo na liberação das gonadotrofinas (Dufour, 2005).

No entanto, já foi provado que o tratamento com utilização do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) associado com Domperidona foi mais potente em induzir maturação inicial e desova da tainha (*Mugil cephalus*), quando comparado à aplicação apenas do GnRH (Aizen *et al*, 2005).

Também para *Anguilla anguilla* foi constatado que na pré- puberdade, a inibição da dopamina (DA) é exigida, provocando a síntese de GnRH e a liberação do FSH e assim iniciando o desenvolvimento ovariano (VIDAL *et al*, 2004). No mussum *Synbranchus marmoratus* um peixe hermafrodita protogínico de água doce, a Domperidona (DOM) associada com um GnRHs não induziu a ovulação, mas fez machos espermiarem em 3 semanas e mostrou evidências de ter atuado na reversão sexual (Ravaglia *et al* 1997).

A utilização de tratamentos hormonais que não exija repetidas aplicações foi reconhecida desde o início da utilização exógena de hormônios (Zohar & Mylonas, 2001). Entre os inúmeros tipos de implantes de liberação controlada que vêm sendo utilizados se destacam o do tipo copolímero de Etileno vinil acetato (EVAc), usado com freqüência em outras espécies, apresentando vantagens em relação a uma única aplicação (Marino *et al*, 2003 Mylonas *et al* 2004; 2007; Ibarra-Castro & Duncan 2007).

Devido à preocupação da redução dos estoques do robalo-flecha (*C. undecimalis*) no ambiente natural, vários pesquisadores deram início nos Estados Unidos a pesquisas com a reprodução da espécie, baseados na captura de animais selvagens e maduros. Experimentos foram realizados com o emprego do hormônio gonadotrófico coriônico humano (HCG) e posteriormente com a utilização do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Parte dos esforços concentra-se na obtenção de desovas sem o emprego de hormônios, através da captura

de animais em momentos que antecedem a desova. A extrusão dos gametas é feita no campo e os ovos transferidos para laboratório para início da larvicultura (Yanes-Roca, 2006, 2009). Os resultados são positivos, mas não necessariamente representam a solução para empreendimentos comerciais.

No México os estudos vêm se concentrando na utilização de sistemas de liberação controlada associados ao uso de GnRH, onde através do produto (Ovoplant®) obtêm-se até 3 desovas consecutivas e ovos fertilizados naturalmente, utilizando reprodutores mantidos em laboratório por ao menos 5 anos (Ibarra-Castro, 2011). Já Contreras-Garcia (2011), utilizando peixes mantidos no laboratório por pelo menos 3 anos utilizou implantes do tipo colesterol com uma dose estimada de até 200 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de LHRHa para obter a desova.

No Brasil, Soligo *et al.* (2008) obtiveram reprodução induzida para *C. undecimalis* pelo emprego de um LHRHa com fêmeas maduras recém-capturadas. Recentemente Ferraz & Cerqueira (2011) utilizaram implantes de LHRHa (com adição de 17α -metil testosterona) para obter a maturação em cativo de machos desta espécie, verificando apenas um aumento no volume de sêmen dos indivíduos que receberam 17α -MT.

Presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito da de implantes de LHRHa associado a um antagonista de dopamina na maturação gonadal do robalo-flecha em cativo, tanto em machos quanto em fêmeas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados e seu histórico

O presente trabalho utilizou animais selvagens coletados em São Francisco do Sul/ SC, mantidos pelo menos há 1 ano em cativo. Todos os animais do experimento foram previamente aclimatados em tanques circulares de 12 m³ (3,2 X 1,5 m) em fluxo contínuo dentro de uma estufa durante 8 meses, antes de serem transferidos ao tanque utilizado no experimento. Durante este período foi feita massagem abdominal em machos e biópsia ovariana em fêmeas, a fim de se identificar o sexo dos peixes e posteriormente transferi-los para o tanque principal na proporção sexual desejada.

Desenho experimental

Os reprodutores utilizados neste trabalho (n=18), com peso médio de 3,400 \pm 2,790 Kg e tamanho médio de 64,6 \pm 17,4 cm, foram

identificados através de “microchip” (ISSO FDX-B 12x2 mm, animal/TAG®). Mantidos em um tanque circulares, de 36 m³ numa densidade de 1,6 kg/m³ com controle de temperatura e fotoperíodo natural, a proporção sexual de 2 machos para cada fêmea.

O tanque se conectava a um sistema de recirculação totalizando 80m³, composto de filtro mecânico, filtro biológico, *protein skimmer*, e seis lâmpadas UV totalizando 540W. A movimentação da água no sistema foi feita por uma bomba de 3 CV o que garantiu renovação de 100% por hora do volume do tanque.

Foram realizados três tratamentos em duplicata, com dois machos e uma fêmea, sorteados ao acaso por réplica: implantes EVAc contendo aproximadamente 100µg para fêmeas e 50 µg para machos de LHRHa + 5mg de DOM Kg⁻¹; implante EVAc contendo somente LHRHa na dose de 100 µg /Kg para fêmeas e 50 µg/ Kg para machos e um tratamento controle com a aplicação do implante sem hormônio. Os reprodutores foram anestesiados com benzocaina (50 mg/L) e uma pequena incisão foi feita com um bisturi na região do abdômen, atrás da nadadeira peitoral e com o auxílio de uma pinça os implantes foram inseridos dentro da cavidade. A temperatura dos tanques em ambos os tratamentos no início foi de 26 °C e após os implantes foi acrescida 0,1°C a cada 24 hs, até atingir a temperatura final de 29 °C, quando foi mantida constante até o final do experimento e a salinidade mantida em 35‰.

Amostras

Foi realizada biópsia ovariana em fêmeas, através da introdução de cânula de 0,6 mm, logo após a aplicação (T₀); vinte dias (T₂₀) e 50 dias após o tratamento hormonal (T₅₀).

Uma parte do conteúdo retirado, menos de 1 cm², foi fixada em Bouin alcoólico, embebido em parafina e seccionado com espessura de 7 µm. Após o processo de coloração com Hematoxilina - Eosina as lâminas foram levadas a microscópio ocular, medidas e fotomicrografadas com auxílio do software Micrometrics ®.

Outra parte da amostra, diretamente após o processo, foi levada a estereoscópio binocular e com auxílio do software Micrometrics ®, foram fotografadas, medidas em um número de cem ovócitos por amostra, e classificada de acordo com Taylor *et al* (1998) nas seguintes classes: Regressão - ovócitos não vitelogênicos - com diâmetro médio DO =100 µm (72 – 125) ; Maturação inicial - ovócito em crescimento primário – com diâmetro médio DO =180 µm (120 – 220); Maturação média - ovócitos em vitelogênese avançada – com diâmetro médio DO=

420 μm (210-520); e Maturação final: ovócitos com diâmetro médio DO 640 μm (470 – 850).

Em machos foi realizada uma massagem abdominal sentido crânio-caudal, em todos os tempos amostrais, e somente em T₅₀ o sêmen foi amostrado através de uma seringa graduada de 1 mL, com a finalidade de coletar o seu volume máximo. Logo após, o sêmen foi levado ao microscópio e analisado após sua ativação em água a 35%, quanto ao tempo de motilidade (duração do movimento do espermatozóide) foi aferido através de cronômetro, a taxa de motilidade ou porcentagem de espermatozóides em movimento no campo ocular, foi separada em 4 classes: 1 - 25% da células se movendo; 2 -50% das células se movendo; 3- 75% das células se movendo e 4 -100% das células se movendo (Viveiros, 2003).

Em ambos os sexos, sempre em conjunto com a biópsia ovariana e massagem abdominal em machos, foram tomadas amostras de 3 mL de sangue coletadas da veia caudal, utilizando uma seringa contendo EDTA 10%, com uma agulha 0,7 x 25 mm. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos em 3500 RPM e o plasma separado em alíquotas mantido a -80° C.

Para a contagem dos eritrócitos foi utilizada a metodologia de Santos *et al* (2009) que consistiu em diluir o sangue numa proporção de 1:2000 utilizando uma solução de Hayem e posterior contagem imediata de células na câmara de Neubauer. Para a análise dos esteróides, estradiol (E₂) testosterona (T) foram utilizados kits ELISA (Intertek®) e para cetotestosterona (11-KT) utilizou-se kits ELISA (Cayman Chemical®), com amostras purificadas seguindo a metodologia descrita na instrução do mesmo.

Confecção dos implantes de hormônio

A composição dos implantes de acetato de polivinil etileno (EVAc) com tempo de liberação estimado em 28 dias, sendo 40-60% do seu conteúdo liberado em 7 dias, baseou-se nos trabalhos desenvolvido por Mylonas *et al* (2007) e o principio da liberação lenta segundo Zohar & Mylonas, (2001).

Uma solução foi feita em uma matriz de acetato de polivinil etileno (Sigma®) segundo Freese *et al* (1989), com algumas modificações. Resumidamente, o LHRHa [des-Gly10, D-Ala6] (Sigma®) Albumina do Soro Bovino liofilizada (BSA, Syngenic®) e Inulina (Sigma®) foram dissolvidos em água deionizada. Para o tratamento GnRH + DOM foi adicionada a Domperidona. No

tratamento Branco, nenhum hormônio foi adicionado a mistura, confeccionada da mesma forma que os outros tratamentos.

A mistura foi congelada e liofilizada por 48h. O pó foi triturado e misturado a 6,5 mL de Cloreto de metileno (MeCl_2) em uma solução de 15% de EVAc misturado durante 5 minutos. As emulsões foram derramadas em moldes de alumínio sobre um bloco de gelo seco. As placas solidificadas foram mantidas a -20°C durante 3 dias e os implantes foram perfurados a partir da matriz seca, usando uma faca dermatológica (Punch Keys de 3 mm).

Análise estatística

Os dados das biopsias ovarianas, análises de sangue, e esteróides foram testados quanto a normalidade e homocedasticidade e foi feita a análise de variância unifatorial com $\alpha=0,05$ (ANOVA) e em seguida teste de Tukey, para se verificar diferenças estatísticas no número de eritrócitos entre tratamentos, sexo, estado de maturação e diâmetro dos ovócitos, volume de sêmen expressado e tempo de motilidade do esperma.

Para calcular as modas dos diâmetros do ovócito se empregou análise de frequência em cada tempo amostral de todas as fêmeas. Foram separadas as classes mais representativas da ultima moda para cada fêmea, e calculada a análise de variância com $\alpha=0,05$ para se verificar possíveis diferenças estatísticas.

Em relação a taxa de crescimento dos ovócitos, para o seu calculo nos intervalos de 20 dias e 50 dias após o implante, foi aplicada a seguinte formula: $\text{TIS} = \text{DOF} - \text{DOi} / G$ adaptada de Gacias *et al* (2011) onde TIS é intervalo de tempo entre amostragens, DOF é diâmetro final no momento da amostragem, DOi é diâmetro inicial no momento da amostragem e G é taxa de crescimento do ovócito no momento da amostragem.

RESULTADOS

Análises dos gametas.

No início do experimento foram observados dois machos com sinal de espermição, um do tratamento GnRH+DOM e outro do tratamento branco e duas fêmeas em estágios mais avançados de ovogênese, sendo uma do tratamento Branco e outra do tratamento GnRH. No decorrer do experimento dois peixes previamente

identificados como fêmeas, um do tratamento GnRH e outro do tratamento Branco.

Ao longo do experimento houve tendência de aumento no diâmetro dos ovócitos para fêmeas e aumento no numero de machos com sinais de espermiacção, conforme demonstram as **Figs. 1a** para fêmeas e **1b** para machos.

(Figura 1. a-b)

Para machos, apesar do aumento de peixes com sinais de maturação, não foram constatadas diferenças significativas entre tratamentos, tanto para número de animais liberando semen, quanto para aspectos qualitativos e quantitativos do sêmen ao final do experimento. em relação a motilidade do sêmen **Fig. 2 a-b**

(Figura 2 a-b.)

Para todas as fêmeas submetidas a tratamento com hormônio, analisando o diâmetro dos ovócitos totais na **Fig. 4a-b** fica claro um crescimento 20 dias após a sua aplicação (T_{20}). Entretanto para a fêmea do tratamento branco, houve uma tendência de regressão no diâmetro dos ovócitos durante o desenvolvimento do experimento.

(Figura 3 a-b.)

Analisando somente a ultima moda dos ovócitos fica claro as diferenças entre fêmeas do tratamentos Branco e GnRH.

(Figura 4 a-b)

Ao analisar a frequência dos ovócitos, de cada fêmea para cada tempo amostral **Figs. 5-7** verificam-se a presença de modas distintas, característica de peixes com desenvolvimento sincrônico em vários grupos. Por terem o mesmo padrão, somente uma fêmea do tratamento GnRh + DOM é apresentada.

(Figura 5.)

(Figura 6)

(Figura 7.)

Caracterizações histológicas dos ovócitos.

Para a fêmea do tratamento controle é notada no momento da aplicação, **Fig. 8-a**, que há presença de ovogônias, ovócitos em desenvolvimento primário, e em grande parte ovócito em média

maturação e ovócitos vitelogênicos. Vinte dias após o implante, **Fig. 8-b**, e cinquenta dias após o implante há uma diminuição no número de ovócitos vitelogênicos, sendo o ovário representado na maior parte por ovócitos em desenvolvimento primário e ovócitos em maturação média.

(Figura 8a-b.)

Na fêmea do tratamento GnRH, no momento anterior a aplicação, **Fig. 9**, há presença em grande maioria de ovócitos vitelogênicos, havendo também ovócitos em maturação média e em desenvolvimento primário, entretanto em menor quantidade. Com o decorrer do experimento há tendência de aumento no diâmetro dos ovócitos vitelogênicos, sem, entretanto mudança na situação qualitativa.

(Figura 9.)

Em relação às fêmeas do tratamento GnRH + DOM, a análise histológica, **Fig.10**, no momento inicial, revela em sua grande maioria ovócitos em desenvolvimento primário e ovogônias, sem a presença de ovócitos vitelogênicos ou em maturação média. Ao longo do experimento há nítido aumento no número de ovócitos em desenvolvimento primário e um incremento no diâmetro, chegando alguns a tamanho médio de ovócitos em média maturação, entretanto sem sinais de início de acumulação de lipídeo.

(Figura 10a-b)

Um peixe do tratamento Branco e outro do tratamento GnRH que ao início do experimento foram classificados como fêmeas, no decorrer do experimento se expressaram como machos **Fig. 11**. Fica claro que ambos os animais possuíam ovócitos em desenvolvimento primário e espermatogônias, entretanto, posteriormente passaram a produzir sêmen, se tornando machos funcionais.

(Figura 11)

Análise de esteroides e eritrócitos

Com a análise dos níveis séricos de estradiol **Fig.13** foi possível classificar a fêmea do tratamento branco como “em maturação” nos primeiros 20 dias e regredida/imatura após 50 dias, a fêmea do tratamento GnRH como vitelogênica no início do experimento e em maturação durante o tempo em durou o experimento e fêmeas do tratamento GnRH+DOM foram classificadas como em maturação

durante todo o experimento. Em todos os tratamentos os níveis séricos deste esteroide foram maiores durante os 20 primeiros dias quando comparados a 50 dias após o início do experimento.

O numero total de eritrócitos entre os tratamentos é apresentado na **Fig. 13**. Em todos os tratamentos é notado um discreto aumento no numero de eritrócitos, entre o momento antes da aplicação (T_0), vinte dias após (T_{20}), não existindo diferença significativa entre tratamentos, comportamento tambem observado entre femeas e machos, maduros e imaturos

(Figura 13)

DISCUSSÃO

Em machos houve tendência de aumento no numero de peixes com sinais de maturação, contudo não foi possível verificar diferenças significativas entre tratamentos ($p>0,05$) em relação a numero de machos maduros, volume total de sêmen, taxa de motilidade do sêmen e tempo de motilidade do sêmen. Sendo os valores parecidos com o já observado para a espécie, em cativeiro e também em animais selvagens (Ferraz & Cerqueira, 2011; Tiersch *et al*, 2004) e um pouco inferiores em relação ao *C. parallelus* (Tiba *et al*, 2009).

Ferraz & Cerqueira (2011) relatam que também não verificaram diferenças significativas entre diferentes tratamentos hormonais testados, contudo os tratamentos com hormônio provocaram um aumento do volume de sêmen, que foi maior nos machos tratados com o esteróide 17 α MT associado ao LHRH se comparado a somente o esteróide 17 α MT. Comportamento também notado nos salmonídeos (Heiraty *et al*, 2011) onde o LHRH parece aumentar o volume de sêmen.

De concreto, diversas experiências mostraram que o GnRH tem a capacidade de estimular a espermatogênese, embora tenha pouco efeito na qualidade do esperma (Aguilleiro, 2007; Mylonas, 2007; Suquet *et al*, 2010)

As terapias hormonais para estimulação da maturação inicial são relativamente raras devido ao limitado conhecimento da função endócrina do cérebro e pituitária durante esta fase, e também é conhecido que a eficácia do GnRH é normalmente limitada a indivíduos que já estão com vitelogênese bem avançada, agindo então não com um iniciador mas sim um acelerador de maturação (Mylonas & Zohar, 2007).

A única exceção, a quase universal incapacidade do GnRH em induzir o início da maturação inicial, é o red sea beam (*Pagrus major*) onde o tratamento com sistemas de liberação de GnRH em fêmeas já maduras, mas reprodutivamente inativas, como também para fêmeas imaturas em fase pré pubertal, induziram vitelogenese seguida por maturação do ovócito, ovulação e desova em 3 semanas. (Mylonas & Zohar, 2007.)

No presente trabalho os tratamentos com hormônio não foram capazes de induzir o começo da vitelogenese, contudo em animais já no início do e sobretudo em estágios mais avançados da maturação gonadal, aceleraram o processo.

Baseado nas pesquisas disponíveis, algumas especulações podem ser feitas a respeito do porque da falha destes tratamentos a base de GnRH que normalmente não estimulam a maturação inicial, enquanto tem sucesso em induzir maturação final do ovócito, ovulação e desova.

Assim como em outras tentativas (Contreras-Garcia, 2011; Ibarra-Castro 2011), com utilização tanto de GnRH quanto GnRH + DOM, após a aplicação do implante na fêmea que ao início do experimento tinha ovócitos com diâmetro próximo ao limite adequado de indução, era de se esperar que ocorresse a desova, o que não foi alcançado.

Em todas as outras tentativas onde houve desova do robalo-flecha, foram utilizados outros tipo de implante e doses maiores (Contreras-Garcia, 2011; Ibarra-Castro 2011).

Ibarra-Castro *et al.*,(2011) utilizaram um único implante de colesterol, comercial, (Ovoplant®, GnRHs + DOM) com dose de 121 ± 31 µg/Kg alcançando até 3 desovas consecutivas por noite. Já Contreras-Garcia, (2011) utilizou-se também de implante de colesterol para alcançar a desova do *C. undecimalis*, desta vez com dose de 200 µg/Kg onde obteve-se melhores resultados. Implante este que possui um tempo de liberação médio de quinze dias, liberando um total de 40-60% nas primeiras 24 horas. (Mylonas & Zohar, 2001).

Fica claro que o implante EVAc foi eficiente em manter uma estimulação continua e prolongada por ao menos 20 dias e sua liberação lenta e continua gerou exposição maior, contudo doses menores, não suprimindo o estímulo necessário das primeiras 24 horas, para que ocorresse maturação final do ovócito, hidratação e desova.

Essa exposição prolongada pôde ainda, levar a uma má regulação dos receptores do GnRH na pituitária (Omeljaniuk *et al.*, 1989). Motivo pelo qual, tão logo tenha sido encerrado esse experimento a fêmea que se mantinha dentro do diâmetro idôneo de

indução, induzida novamente, desta vez com única injeção com dose 50 µg/Kg de LHRHa levou 68 horas para desovar, sendo o tempo de latência normal para espécie e *C. parallelus* de 35-42 horas. (Ferraz *et al*, 2002; Reis & Cerqueira, 2003; Cerqueira *et al*, 2005; Ibarra-Castro, 2011; Contreras-Garcia, 2011).

O que indica que possam ser necessárias doses maiores para este tipo de sistema de liberação controlada.

Neste experimento o tratamento GnRH + DOM foi capaz de estimular um aumento no diâmetro dos ovócitos, entretanto não foi capaz de iniciar a vitelogenese, mostrando que a dopamina parece não exercer um papel primordial neste estágio da maturação gonadal, do robalo-flecha. Tendência essa já relatada em outros casos, pois em geral a inibição da dopamina regula ativamente as fases finais da gametogenese, seja a ovulação ou a espermição. (Dufour *et al*, 2005).

Poucos estudos abordam a regulação da dopamina na produção do FSH, apesar de que ela, parece desempenhar um papel inibitório na liberação do FSH na truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) e mesmo entre espécies que expressam efeito de inibição da dopamina, grandes variações na intensidade da inibição foram notadas sugerindo a um papel maior da dopamina em algumas espécies, como os ciprinídeos e menor em outras como os salmonídeos (Dufour *et al*, 2005).

No *striped bass* (*Morone saxatilis*) tratamentos combinados com GnRH + Testosterona e Pimozida um inibidor de dopamina indicam que não existe envolvimento da dopamina no controle da puberdade (Holland *et al*, 1998). No pargo (*Pagrus major*) só a utilização do GnRH foi suficiente para induzir a puberdade precocemente, demonstrando que também não ha papel da dopamina no processo (Kumakura *et al*, 2003).

Na enguia a remoção da dopamina é necessária para ativar a liberação da gonadotrofina e o desenvolvimento do ovário (Dufour, 2010) e mais recente, na tainha (*Mugil cephalus*) a inibição da dopamina mostrou ter papel em dois diferentes estágios do ciclo reprodutivo, não apenas na fase de maturação final do ovócito e ovulação, mas também, nos estágios iniciais da vitelogenese (Aizen *et al*, 2005).

Como nenhuma fêmea do tratamento GnRH + DOM apresentava sinais mais avançados de maturação, ficando limitado no máximo à fase de maturação inicial durante todo o experimento, o efeito do inibidor de dopamina Domperidona, na fase da maturação final do ovócito e desova permanece em questão.

Existe interação no número de eritrócitos entre o sexo e o estágio de desenvolvimento das gônadas e dessas com as condições eco

fisiológicas e com a idade dos peixes. A temperatura da água também provoca aumento das atividades biológicas e metabólicas dos peixes aumentando o número de eritrócitos. Entretanto outros fatores não controlados como fotoperíodo e dieta atuam individualmente ou simplesmente sendo responsáveis por diferenças (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Os números totais de eritrócitos encontrados, vão de acordo com dados obtidos para a espécie congênere *Centropomus paralellus* (Santos *et al*, 2009.) tanto para fêmeas e machos, e animais maduros e imaturos, entretanto os valores observados não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos, sexo e condição reprodutiva.

Ainda que a técnica de histologia por amostra de biopsia ovariana já seja conhecida, ela pode variar de espécie para espécie e da condição sexual de cada peixe e apesar da limitação na técnica de “emblocagem” da amostra ovariana, onde o xilol utilizado na fase de desidratação do tecido varreu o conteúdo lipídico do ovócito, devido ao rompimento das membranas no momento da canulação, deixando buracos na lamina ainda é possível notar e diferenciar os ovócitos nas suas respectivas fases. Ainda assim por ser necessário o sacrifício dos animais, em nenhum momento a fixação da gônada inteira foi considerada como opção.

Se pensarmos na temperatura como efeito aproximador de maturação final e desova. Ferraz e Cerqueira (2010) avaliaram dois regimes térmicos com temperatura de 26° C e seus efeitos na espermiacão de machos não constatando diferenças significativas. Claro indicativo de que este efeito pode ser controlado por estímulos distintos aos testados neste trabalho.

Neste estudo, no regime térmico em que a temperatura subiu 26-29 °C, independente do tratamento, cinco machos (28% do plantel) apresentaram sinais de espermiacão e no período com temperatura constante de 29 °C, seis machos (33,3% do plantel) apresentaram sinais de maturação. Indicativo de que por si este efeito não é o único responsável pela maturação sexual.

Um dado que merece mais atenção, é o fato de dois peixes, identificados como fêmeas, de diferentes tratamentos 20 dias após o implante, apresentarem sinais de espermiacão. A biologia reprodutiva de inúmeros peixes hermafroditas, em cativeiro já foi estudada em outros trabalhos e isso correspondeu a um fato normal (Godwin, 2010; Munday *et al* 2006).

Fica claro, nestes peixes que no momento inicial do experimento além de ovócitos em desenvolvimento primário havia um conjunto de

células em divisão; com forma de botão de rosa, diferente das demais, indicando segundo Grier & Taylor, (2005) a existência de espermatogônias.

Godwin (2010) relata que a mudança de sexo gonadal pode ser relativamente rápida e em algumas espécies esta transição não dura mais de 8 a 10 dias e que os neurônios imunorreativos de GnRH no hipotálamo estão em maior número em machos em fase de transição tanto no *Bluehead wrase* (*Thalassoma bifasciatum*), quanto no peixe palhaço “Skunk” (*Amphiprion melanopus*), hermafrodita protândrico tal como o robalo flecha.

Alguns peixes hermafroditos protândricos iniciam a transformação do ovário de diferentes maneiras (Casadevall, 2009), por isso não se pode afirmar que o material canulado, corresponde a maior proporção do ovário, sem o sacrifício dos peixes e análise da gônada inteira. Logo não é possível afirmar qual era a condição reprodutiva real destes animais e os possíveis efeitos dos tratamentos.

CONCLUSÕES

Para a espécie não há diferenciação no número de eritrócitos, entre machos e fêmeas e maduros e imaturos, nem entre tratamentos.

Nos machos embora tenha havido tendência um aumento no número de peixes com sêmen, a longo do período experimental, não houve diferenças estatísticas entre tratamentos, quanto a volume, taxa de motilidade e tempo de motilidade.

Em fêmeas a dopamina não representou bloqueio à vitelogênese. Tanto o tratamento GnRH+DOM, quanto o tratamento com somente GnRH tiveram crescimento no diâmetro dos ovócitos, independente da fase de desenvolvimento do ovário.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior) pela concessão das bolsas de estudo, ao MPA (Ministério de Pesca e Aquicultura) e o professor Dr. Hilton Amaral Junior pelos recursos provenientes do projeto: “Desenvolvimento de sistemas para a reprodução e engorda do robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) em água doce e fazendas de carcinicultura marinha”, registro: CNPq 559790/2009-0 e a UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina) pelos demais recursos alocado na pesquisa.

Dr. Evoy Zaniboni Filho pelas contribuições e sugestões durante o desenvolvimento do artigo. A professora Dr. Evelise Nazari pelo auxílio e orientação nas técnicas histológicas das biopsias ovarianas e ao Dr. Afonso Bairy do LABCAI/UFSC (Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica) e professora Dr. Renata Moreira Guimarães do LAMEROA / USP (Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos) pelo auxílio nas análises de esteróides sexuais.

LITERATURA CITADA

Aguilleiro, M. J., Scott, A. P., Duncan, N., Mylonas, C. C., Cerda, J. 2007. Treatment of GnRH α -implanted Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with 11-ketoandrostenedione stimulates spermatogenesis and increases sperm motility. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147(A): 885–892.

Aizen, J., Meiri, I., Tzchori, I., Levavi-Sivan, B., Rosenfeld, H. 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology*, 142: 212–221.

Alvarez-Lajonchère, L. S., Cerqueira, V. R., Silva, I. D. 2002. Mass production of juveniles of the snook *Centropomus parallelus* in Brazil. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33(4): 506-516.

Casadevall M., Delgado, E., Colleye, O., Ber Monserrat, S. Parmentier, E. 2009. Histological study of the sex-change in the skunk clownfish *Amphiprion akallopisos*. *The Open Fish Science Journal*, 2: 55-58.

Cerqueira, V. R. 2002. Cultivo do Robalo: Aspectos da Reprodução, Larvicultura e Engorda. Florianópolis, UFSC, 94 p.

Cerqueira, V. R. & Tsuzuki, M. Y. 2009. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 17–28.

Contreras Garcia, M. de J. 2011. Inducción de la reproducción en *Centropomus undecimalis* y *Centropomus parallelus* bajo condiciones de cautiverio empleando inyecciones e implantes de GnRH- α . unpublished M.Sc. Thesis, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México, 121 p.

- Dufour, S., Burzawa-Gerard, E., Le Belle, N., Sbahi, M., Vidal, B. (2003) Reproductive endocrinology of the European eel, *Anguilla anguilla*. In: Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (eds) *Eel Biology*. Springer, Tokyo, 373–386 p.
- Dufour, S., Weltzien, F. A., Sebert, M. E., Le Belle, N., Vidal, B., Vernier, P., Pasqualini, C. 2005. Dopaminergic Inhibition of Reproduction in Teleost Fishes. *Annual New York Academy of Sciences*. 1040: 9–21.
- Dufour, S., Sebert, M. E., Weltzien, F. A., Rousseau, K., Pasqualini, C. 2010. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *Journal of Fish Biology*, 76: 129-160
- Ferraz, E. M., Cerqueira, V. R., Alvarez-Lajonchère, L., Candido, S. 2002. Indução da desova do robalo-peva, *Centropomus parallelus*, através de injeção e implante de LHRHa. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 28: 125-133.
- Ferraz, E. M. & Cerqueira, V. R., 2010. Influência da temperatura na maturação gonadal de machos do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 36(2): 73-83.
- Ferraz, E. M. & Cerqueira, V.R. 2011. Indução da maturação gonadal do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* (Block, 1972) em cativeiro: aplicação de diferentes protocolos de indução da maturação e induções hormonais. *Bioikos*, 25(2): 137-148.
- Freese, A., Sabel, B. A., Saltzman, W. M., During, M. J., Lamger, R. 1989. Controlled release of dopamine from a polymeric brain implant: *In vitro* characterization. *Experimental Neurology*, 103(3) : 234-238.
- Ganias, K.; Nunes, C.; Valvalidis, T.; Rakka, M.; Stratoudakis, Y. 2011. Estimating oocyte growth rate and its potential relationship to spawning frequency in teleosts with indeterminate fecundity. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*, 3: 119-126.
- Grier, H. J. & Taylor, R. G. 2005. Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology*, 53: 521-542.
- Godwin, J. 2010. Neuroendocrinology of sexual plasticity in teleost fishes. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 31: 203-216.

Heyrati, F. P., Amiri, B. M., Dorafshan, S. et al. 2010. Effect of GnRHa injection on milt volume in recently stripped rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research*, 41: 487-492.

Holland, M. C., Hassin, S., Zohar, Y. 2002. The effects of long-term testosterone, gonadotropin releasing hormone agonist and pimozide treatments on testicular development and luteinizing hormone levels in juvenile and early maturing striped bass, *Morone saxatilis*. *General Comparative Endocrinology*, 129: 178-187.

Ibarra-Castro, L. & Duncan, N. J.. 2007. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture*, 272 :737-746.

Ibarra-Castro, L., Alvarez-Lajonchere, L., Rosas, C., Palomino-Albarran, I. G., Holt, G. J. Sanchez-Zamora, A. 2011. GnRHa-induced spawning with natural fertilization and pilot-scale juvenile mass production of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). *Aquaculture*, 319: 479-483.

Kumakura, N., Okuzawa, K., Gen, K., Kagawa, H. 2003. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on hypothalamus-pituitary-gonadal axis of prepubertal female red seabream (*Pagrus major*). *General Comparative Endocrinology*, 131: 264-273.

Marino, G., Panini, E., Longobardi, A., Mandich, A., Finioia, M. G., Zohar, Y., Mylonas, C. C. 2003. Induction of ovulation in captived-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture*, 219: 841-858.

Munday, P. L., Buston, P. M., Warner, R. R. 2006. Diversity and flexibility of sex-change strategies in animals. *Trends in Ecology and Evolution*. 21:89-95.

Mylonas, C.C., Papandroulakis, N., Smboukis, A., Divanach, P. 2004. Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRHa implants. *Aquaculture*, 237: 141 - 154.

Mylonas, C. C., Bridges, C., Gordin, H., Ríos, B. A., Gárcia, A., De La Gandára, F., Fauvel, C., Suquet, M., Medina, A., Papadaki, M., Heinisch, De Metrio, G., Corrieiro, A., Vassalo-Agius, R., Guzmán, J. M., Mañanos, E., Zohar, Y. 2007 - Preparation and administration of gonadotropin releasing-hormone (GnRH) implants for the artificial

control of reproductive maturation in captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). *Reviews in Fisheries Science*, 15(3): 183-210.

Mylonas, C. C., Fostier, A., Zanuy, S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General Comparative Endocrinology*, 165(3): 516-534.

Mylonas, C. C. & Zohar, Y. 2001. Use of GnRH α - delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 463–491.

Mylonas, C.C. & Zohar, Y. 2007. Pp. 437-474. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin P.J. & Lubzens, E (Eds). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. New York, Springer Press. 508 p.

Omeljaniuk, R. J., Habibi, H. R., Peter, R. E. 1989. Alteration in pituitary GnRH and dopamine receptors associated with the seasonal variation and regulation of gonadotropin release in the goldfish (*Cassius auratus*). *General Comparative Endocrinology*, 74: 392-399.

Peters, K. M Matheson, R. E., Taylor, R. G. 1998. Reproduction and early life history of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), in Florida. *Bulletin of Marine Science*, 62 (2): 509– 529.

Ravaglia, M. A., Lo Nostro, F. L., Maggese, M. C., Guerrero, G. A., Somoza, G. M.. Characterization of molecular variants of GnRH, induction of spermiation and sex reversal using salmon GnRH-A and domperidone in the protogynous diandric fish, *Synbranchus marmoratus* Bloch, (Teleostei, Synbranchidae). *Fish Physiology and biochemistry*, 16: 425–436, 1997.

Reis, M. A., Cerqueira, V. R. 2003. Indução de desova do robalo-peva (*Centropomus parallelus*) Poey 1860, com diferentes doses de LHRH. *Acta Scientiarum Animal Science*, 25: 53-59.

Roberts, D. E., Halstead, W. G., Grier, H. J.; Vermmer, G. K., Reese, R. O., Willis, S. A. 1998. Source spawning common snook, *Centropomus undecimalis* circadian rhythms and hatchery management. *Journal of World Aquaculture Society*, 19(1): 60.

Saltzman, M.W. 2001. Drug Delivery Engineering Principles for Drug Therapy. New York, Oxford University Press, 2001, 372p.

Santos, A. A., Egami, M. I., Ranzani-Paiva, J. M., Juliano, Y. 2009. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*): Seasonal variation, sex and gonadal maturation. *Aquaculture*, 296: 359-366.

Soligo, T.A., Ferraz, E. M., Cerqueira, V. R., Tsuzuki, M. 2008. Pp 143-152. Primeira experiência de indução hormonal, desova e larvicultura do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* no Brasil. In: Cyrino, J. E. P., Scorvo Filho, J. D., Sampaio, L. A.; Cavalli, R.O. (Eds) Tópicos especiais em biologia aquática e aqüicultura II. Jaboticabal, Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática. 376p.

Suquet, M., Cosson, J., De La Gándara, F., Mylonas, C. C., Papadaki, M., Lallemand, S., Fauvel, C. 2010. Sperm features of captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Journal of applied Ichthyology*, 26: 775-778.

Tavares-Dias, M. & Moraes, F. 2004. Pp 56-77. Influencia de fatores bióticos sobre as variáveis hematológicas. In: Tavares-Dias, M & Moraes, F. (Eds). *Hematologia de Peixes Teleósteos*. Ribeirão Preto, Villimpress. 144p.

Taylor, R. G., Grier, H. J, Whittington, J. A. 1998. Spawning rhythms of common snook in Florida. *Journal of Fish Biology*, 53: 502-520.

Tiba, R. M., Oliveira, I. R., Serralheiro, P. C. S., Ostini, S. 2009. Diluentes e proporções sêmen: diluente na crioconservação do sêmen do robalo-peva *Centropomus parallelus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 35: 99-110.

Tiersch, T.R.; Wayman, W. R.; Skapura, D.P; Neidig, C.L.; Grier, J. H. 2004. Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis*. *Aquaculture Research*, 35: 278-288.

Vidal, B., Pasqualini, C., Le Belle, N., Holland, M. C .H., Sibahi, M., Vernier, P., Zohar, Y., Dufour, S. 2004. Dopamine Inhibits Luteinizing Hormone Synthesis and Release in the Juvenile European Eel: A Neuroendocrine Lock for the Onset of Puberty. *Biology of Reproduction*, 71: 1491–1500.

- Viveiros, A.T.M., Jatzkowski, A., Komen, J.2003. Effects of oxytocin on semen release response in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, 59: 1905– 1917.
- Wallace, R.A; Boyle, S.M.; Grier, S.J.; Selman, K., Petrino, T. R.1993. Preliminary observations on oocyte maturation and other aspects of reproductive biology in captive female snook, *Centropomus undecimalis*. *Aquaculture*, 116: 257- 273.
- Yanes-Roca, C. 2006. Husbandry and larval rearing of common snook (*Centropomus undecimalis*). 2006.. Unpublished Ph.D. Dissertation, Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland, 271p.
- Yanes-Roca, C., Rhody, N., Nystrom, M., Main,, K.L. 2009. Effects of fatty acid composition and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook (*Centropomus undecimalis*). *Aquaculture*, 287: 335-340.
- Zohar, Y. & Mylonas, C. C.2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99–136.

FIGURE LEGENDS

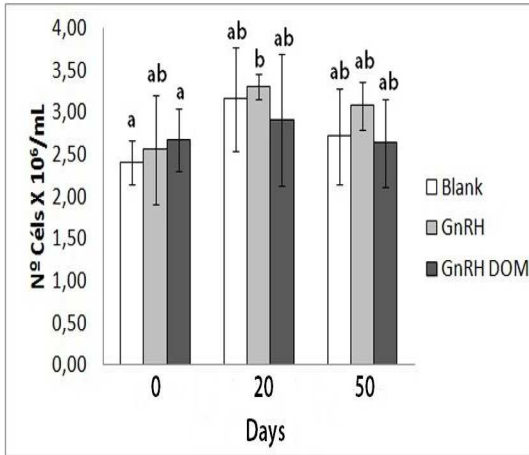


Fig. 1. Total number of erythrocytes X 10⁶ / mL.. Different letters mean statistical difference.

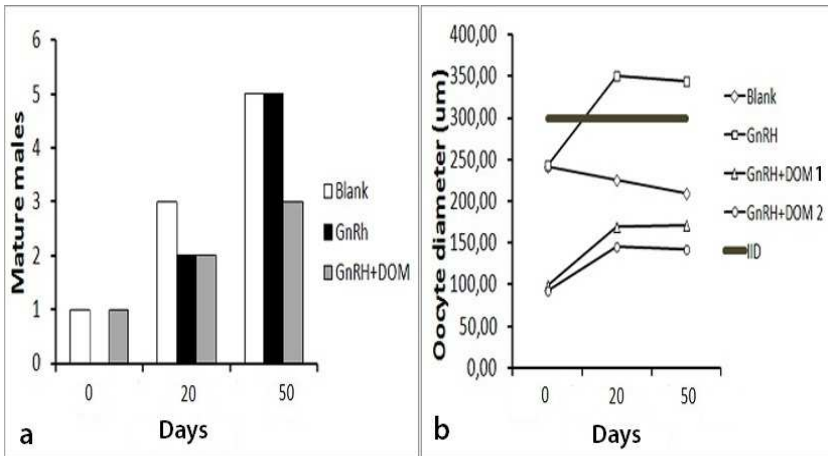


Fig. 2. Sexual maturation throughout the experiment. a- Number of mature males off each sample time ; b-oocyte development, IID: means idoneuos induction diameter.

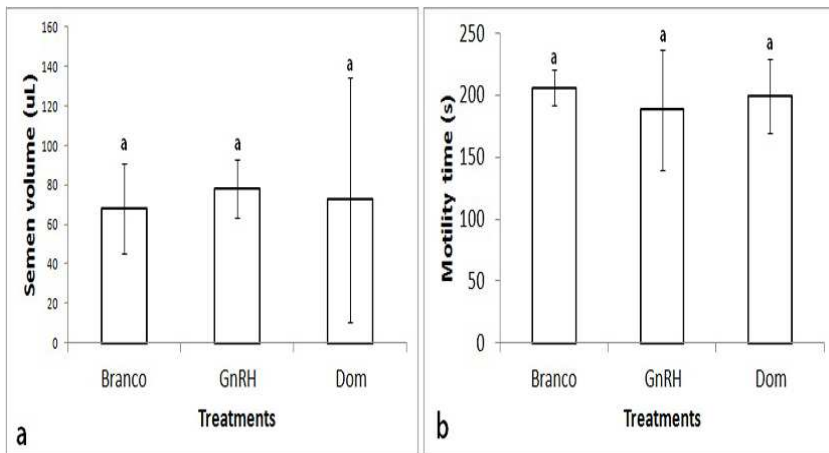


Fig. 3. Quantitative and qualitative aspects of semen collected at the end of experiment. a- Semen volume; b- Motility time. Different letters mean statistical difference.

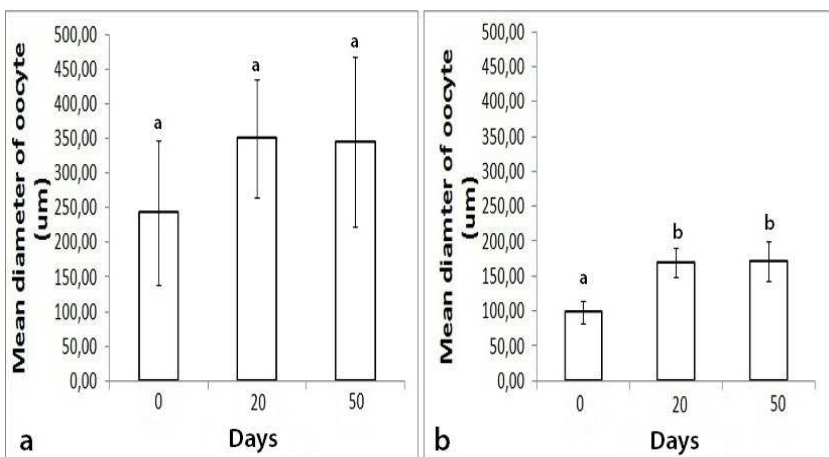


Fig. 4 Mean diameter of total oocytes. a- Treatment GnRH female; b- Treatment GnRH + DOM female. Different letters mean statistical difference.

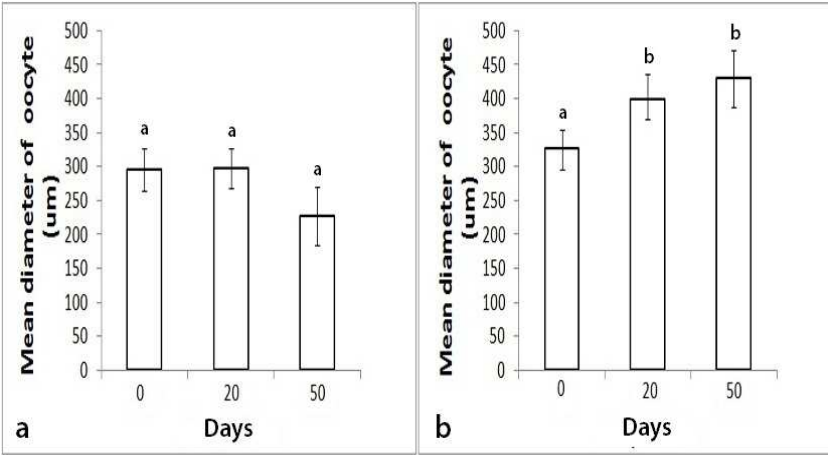


Fig. 5. Mean diameter of total oocytes. a- Treatment Blank female; b- Treatment GnRH female. Different letters mean statistical difference.

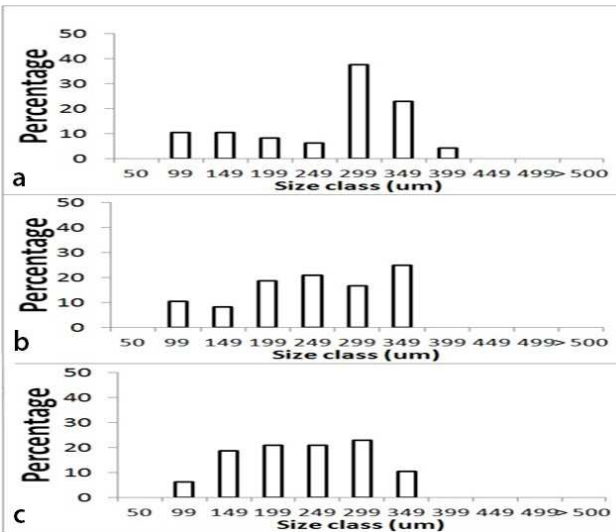


Fig. 6. Frequency of oocytes in treatment Blank female. a- T₀; b- T₂₀; c- T₅₀

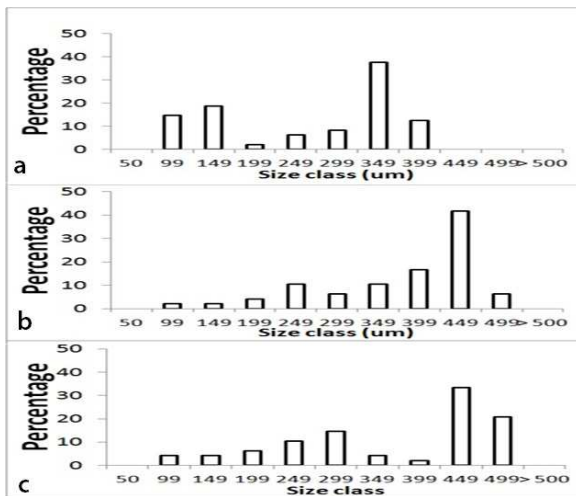


Fig. 7. Frequency of oocytes in treatment GnRH female. a- T₀; b- T₂₀; c- T₅₀

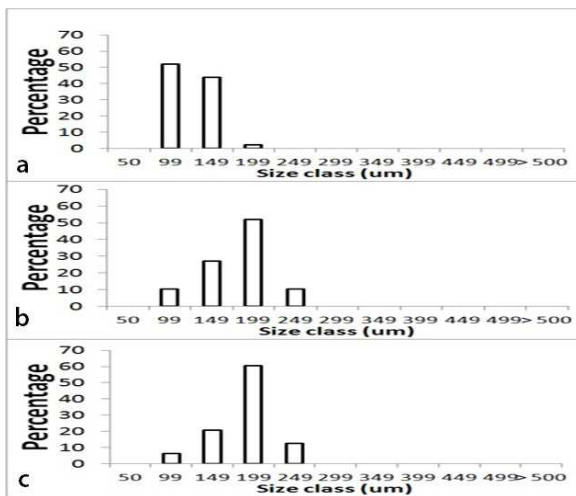


Fig. 8. Frequency of oocytes in treatment GnRH + DOM female 1. a- T₀; b- T₂₀; c- T₅₀

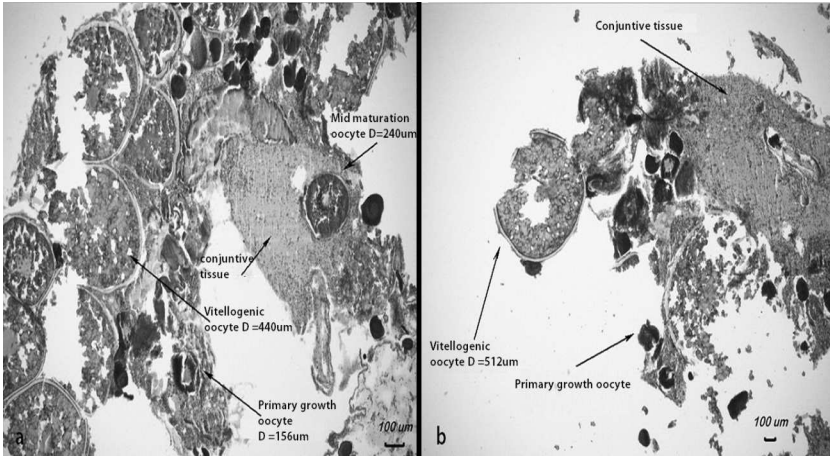


Fig. 9. Gonadal histological analysis of Blank treatment female. a- sample time T_0 ; b- sample time T_{20} Magnification 100X. Bar indicates 100 μm

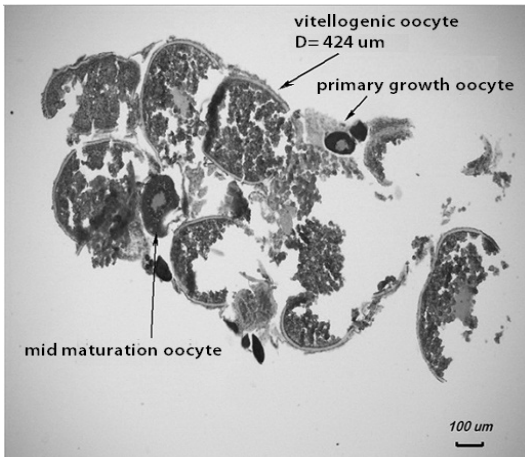


Fig. 10. Gonadal histological analysis of GnRH treatment female. a- sample time T_0 ; b- sample time T_{20} Magnification 100X. Bar indicates 100 μm

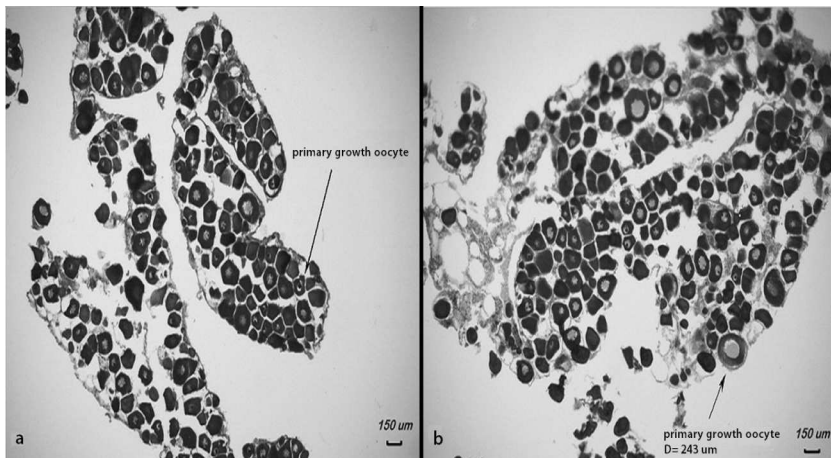


Fig. 11. Gonadal histological analysis of GnRH+DOM treatment female 1. a- sample time T_0 ; b- sample time T_{20} Magnification 100X. Bar indicates 150 μm

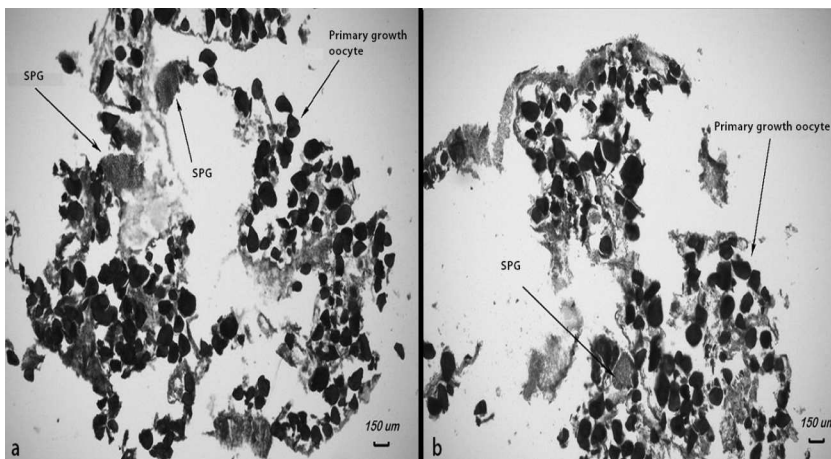


Fig. 12. Gonadal histological analysis of two fish, characterized as female through experiment. a- sample time T_0 of blank treatment fish; b- sample time T_0 of GnRH treatment fish. SPG = Spermatogonia. Magnification 100X. Bar indicates 150 μm .

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No ano de 2010, ingressei no mestrado em aquíicultura do programa de pós graduação em aquíicultura da Universidade Federal de Santa Catarina sob orientação do professor Dr. Vinicius Cerqueira.

Com a aprovação do projeto denominado “Desenvolvimento de sistemas para a reprodução e engorda do robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) em água doce e fazendas de carcinicultura marinha”, registro: CNPq 559790/2009-0, sob coordenação do professor Hilton Amaral Junior em parceria com o LAPMAR, uma demanda do laboratório era a produção de juvenis de robalo-flecha em cativeiro, assunto esse que sempre me interessei.

Uma vez definido o projeto no qual trabalhei durante 2 anos, iniciaram-se as etapas conseqüentes entre elas, a montagem e adequação da sala de maturação de reprodutores M1. Sem duvida esta fase, foi a que consumiu mais tempo e esforço, ao longo de 1 ano e 3 meses, em que pude aprimorar meus conhecimentos sobre montagem e manutenção de sistemas de recirculação de água.

Nesta etapa o trabalho se iniciou com a demolição do antigo tanque, passagem da tubulação de esgotamento dos novos tanques, fundação, nivelamento e montagem dos novos tanques e ligações hidráulicas do sistema de recirculação. Durante esta etapa em concomitância, foram realizados contatos com proprietários de fazendas de camarões para possível captura de novos reprodutores, sobretudo fêmeas, pois havia desconfiança que animais mais antigos, por conta das condições anteriores a que foram submetidos, teriam desenvolvido um bloqueio reprodutivo.

No início do ano de 2011 foram capturados em Araquari / SC com auxílio da EPAGRI, 14 reprodutores de robalo-flecha gentilmente cedido pelo dono da fazenda Ilha das Palmas, Guilherme Ottoni Zimmermann. Estes 14 peixes foram transportados até o LAPMAR, identificados e aclimatados ao longo de 8 meses em tanques de 18m³. Esta etapa do trabalho, originou o resumo publicado nos anais do XIV Congresso Latino Americano de Ciências do Mar, intitulado “Transporte, sexagem e aclimação de reprodutores de Robalo flecha (*Centropomus undecimalis*, Block 1792) para a manutenção em cativeiro”

A princípio, a idéia inicial era utilizar implantes do tipo colesterol com liberação mais rápida, entretanto experimentos prévios utilizando este mesmo implante associado ao hormônio feminilizante estradiol em

machos de robalo-flecha, com o objetivo de induzir a inversão sexual, demonstrou que a “quebra” da matriz do implante no momento da aplicação, poderia ocasionar a uma taxa de liberação até 2 vezes mais rápida, ocasionando o óbito por conta da overdose liberada.

Logo se optou pelo tipo de implante EVAc por conta de sua matriz polimérica inquebrável. Na confecção deste tipo de implante foi levado em consideração, modelos propostos por outros autores por conta da dificuldade em mensurar a cinética da liberação *in vitro*. Como a velocidade de liberação é dada pelo tamanho da molécula e quantidade do agente de mistura e também a área de superfície do implante, nenhum destes itens foi modificado.

Este tipo de implante, jamais havia sido confeccionado no país, sendo sempre necessária a importação dos implantes já prontos. Desta forma o presente trabalho, fornece subsídios para a utilização desta tecnologia em futuros estudos, tornando-a mais acessível e barato.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para a primeira desova de animais totalmente oriundos de cativeiro, representando um grande avanço para o protocolo de reprodução e conseqüentemente estabelecimento do robalo-flecha, como espécie potencial para o desenvolvimento da piscicultura marinha no país.

Assim destaco a importância da utilização de implantes de liberação lenta do tipo EVAc e a necessidade de realizar novos experimentos, afim de se conhecer todas as potencialidades desta tecnologia, como também novos experimentos a respeito do comportamento reprodutivo dos animais, sobretudo a questão da inversão sexual.

BIBLIOGRAFIA GERAL

AGER, L.A. et al. Artificial spawning of snook *Centropomus undecimalis*. In: ANNUAL CONFERENCE SE GAME AND FISH COMMISSION, 1976, Hambug, Estados Unidos. **Proceedings...** p. 158-166, 1976.

AIZEN et al. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. **General and Comparative Endocrinology**, v. 142, p. 212–221, 2005

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.S. et al. Mass production of juveniles of the snook *Centropomus parallelus* in Brazil. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v.33, n. 4, p. 506-516, 2002.

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L. Cultivo de robalos: Potencialidades e resultados. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 85, p. 15-21, set./out. 2004.

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; TSUZUKI, M.Y. A review of methods for *Centropomus spp.* (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 684-700, 2008.

ANDRADE, D.R.; YASUI, G.S. O manejo da reprodução artificial e natural e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n.2, p. 166-172, 2003.

BOEUF, G.; LE BAIL P.Y. Does light have an influence on fish growth? **Aquaculture**, v. 177, p. 129–152, 1999.

BROMAGE, N; et al. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin **Aquaculture**, v. 197, p. 63-98, 2001.

BROMAGE, N; ROBERTS, R.J. **Broodstock management and egg larval quality**. Blackwell Science Ltda., Oxford, 424p, 1995.

CERQUEIRA, V.R. **Cultivo do Robalo: Aspectos da Reprodução, Larvicultura e Engorda**. Florianópolis: UFSC - Ed. do Autor, 2002. v. 1 , 94 p.

CERQUEIRA, V.R. 2009 Spawning and larviculture of the fat snook (*Centropomus parallelus*) and the common snook (*Centropomus*

undecimalis) in Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE BIOLOGY AND CULTURE OF SNOOKS, 2, Villahermosa, Mexico, 13-15/jul/2009, **Resúmenes...**CDROM.

CERQUEIRA, V.R. e TSUZUKI, M.Y. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 17–28, 2009.

COSTA, H.R. Experimento de indução em *Centropomus undecimalis*. I estudo do ciclo de atividade sexual e experimentos de indução. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 8, 1981, Brasília, DF, **Resumos...**, p. 104-105, 1981.

DONALDSON, E.M; HUNTER, G.M.. **Induced final maturation, ovulation, and spermiation**. In: W.S. Hoar; D.J. Randall; E.M. Donaldson, editors. *Fish physiology*. New York: Academic Press, v.9, p.351-403, 1983..

DUFOUR, S. et al. Dopaminergic Inhibition of Reproduction in Teleost Fishes. **Annual New York Academy of Sciences**. 1040: 9–21, 2005.

EDWARDS, R.E.; HENDERSON, B.D. An experimental hatchery project: Studies of propagation, culture and biology of snook (*Centropomus undecimalis*). In: ANNUAL GULF AND CARIBBEAN FISHERIES INSTITUTE, 38., 1985, Trois-Islets, Martinique. **Proceedings...** p. 211-221, 1985.

FERRAZ, E.M. et al. Indução da desova do robalo-peva, *Centropomus parallelus*, através de injeção e implante de LHRHa. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, p. 125-133, 2002.

FERRAZ, E.M **Aspectos sobre a reprodução do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* e do crescimento de alevinos do robalo-peva, *Centropomus parallelus* em laboratório**. 2009. 96 f. Dissertação (Doutorado em Aquicultura) - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

FONTENELE, O. Injecting pituitary (hypophyseal) hormones into fish to induce spawning. **Prog. Fish-Cult.** V. 18, p. 71–75, 1955.

FRAGA, I. et al.. Desarrollo de un banco de reproductores de Róbalo (*Centropomus undecimalis*, Bloch 1792): I. Manejo del alimento. CIVA, p. 1-9, 2006.

GRIER, H.J; TAYLOR, R.G. Testicular maturation and regression in the common snook. **Journal of Fish Biology**, v. 53, p. 521-542. 2005

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J.. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: IDRC, p.144, 1993.

HOLLAND, M. C. et al. The effects of long-term testosterone, gonadotropin releasing hormone agonist and pimoziide treatments on testicular development and luteinizing hormone levels in juvenile and early maturing striped bass, *Morone saxatilis*. **General Comparative Endocrinology**, v. 129, p. 178–187, 2002.

Ibarra-Castro, L. & Duncan, N. J.. GnRH α -induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. **Aquaculture**, 272 :737–746. 2007

KENT, J.S. et al. The use of a cholesterol matrix pellet implant for early studies on the prolonged release in animals of agonist analogues of luteinizing hormone releasing hormone. **Controlled Release of Bioactive Materials**, v. 17, p. 123–125. 1980.

LEE, C.S. et al. Induced maturation and spawning of milkfish, *Chanos chanos* Forssakal, by hormone implantation. **Aquaculture**, v. 52, p. 199-205, 1986a.

LEE, C.S. et al. Influence of chronic administration of LHRH- analogue and / or 17 α -

methyltestosterone on maturation in milkfish, *Chanos chanos*. **Aquaculture**, v. 59, p. 147-159, 1986b.

LEE, C.S. et al. Technique for making chronic-release LHRH-a and 17 α -methyltestosterone pellets for intramuscular implantation in fishes. **Aquaculture**, v. 59 p. 161-168, 1986c.

MARINO, G. et al Induction of ovulation in captived-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) with a sustained-release GnRH α implant. **Aquaculture**, 219: 841-858. 2004

MCGUREN, J. et al. Hormone implants accelerate maturation in barramundi. The State of Queensland (Department of Primary Industries and Fisheries) 2005.

MYLONAS, C.C., et al. Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRHa implants. **Aquaculture**, 237: 141 – 154, 2004

MYLONAS, C.C.; ZOHAR, Y. Use of GnRHa - delivery systems for the control of reproduction in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, p. 463–491, 2001. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

NEIDIG, C.L. et al. Preliminary study - A comparison of doses of human chorionic gonadotropin (HCG) on ovulation, egg quality and larval survival in common snook, *Centropomus undecimalis* [Bloch] In: INT. SYMP. ON THE REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 6, 4-9 Jul, Bergen (Norway), 1999., **Proceedings...**, Bergen, University-of-Bergen. p. 429, 1999.

NEIDIG, C.L. et al. Induction on ovulation in common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch) using Human Chorionic Gondotropin (HCG) and Gonadotropin releasing hormone (GNRH) In: 52nd Gulf and Caribbean Fisheries Institute, 2001. **Proceedings...**p 360-362, 2001.

PANKHURST, N.W.; PORTER, M.J.R. Cold and dark or warm and light: variations on the theme of environmental control of reproduction. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 385–389, 2003.

PATIÑO, R.; SULLIVAN, C.V. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 57-70, 2002.

PETERS, K.M et al. Reproduction and early life history of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), in Florida. **Bulletin of Marine Science**, v. 62: (2) p. 509– 529, 1998.

RAVAGLIA et al. Characterization of molecular variants of GnRH, induction of spermiation and sex reversal using salmon GnRH-A and domperidone in the protogynous diandric fish, *Synbranchus marmoratus* Bloch, (Teleostei, Synbranchidae). **Fish Physiology and biochemistry**, vol. 16, p. 425–436, 1997.

REPRO-DOTT. Maturation in Captivity and spawning induction using hormonal therapies IN: FERNANDEZ, A. **Reproduction of the Bluefin Tuna in Captivity feasibility study for the domestication of Thunnus**

thynnus. Final report, FP5 Quality of Life an management resources shared-coast RTD project, p.157-171, 2011

REYES, R., et al. Creación de un banco de progenitores de Róbalo *Centropomus undecimalis*, Bloch. Evaluación de alimentos artificiales. **CIVA**, p. 814-820, 2004.

ROBERTS, D.E. et al. Source spawning common snook, *Centropomus undecimalis* circadian rhythms and hatchery management. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 19, n. 1, p. 60, 1988.

SANCHES, A. et al. Maturation and spawning of common snook: First experiences in Southeast Mexico. **World Aquaculture Magazine**, v. 33:1, p. 62-65, 2002.

SANCHEZ-ZAMORA, A. 2009. Status of the common snook reproduction in captivity at UMDI, UNAM, Sisal, UNAM, Yucatán, México. In: International Symposium on the Biology and Culture of Snooks, 2, Villahermosa, Mexico, 13-15/jul/2009, **Resúmenes...CD-ROM**.

SCHULZ, R.W. et al. Gonadotropin, their receptors, and the regulation of testicular functions in Fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v.129, p. 407-417, 2001.

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

SKAPURA, D.P. et al. Induction of ovulation in common snook, *Centropomus undecimalis*, using gonadotropin-releasing hormones In: INT. SYMP. ON THE REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 6., 4-9 Jul/1999, Bergen (Norway). **Proceedings...** Bergen: University-of-Bergen. p. 430, 1999.

SOLIGO, T.A. et al. Primeira experiência de indução hormonal, desova e larvicultura do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* no Brasil. In: Cyrino, J. E. P., Scorvo Filho, J. D., Sampaio, L. A.; Cavalli, R.O. (Eds) **Tópicos especiais em biologia aquática e aqüicultura II**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática. 376p. 2008.

TAMARU, C.S. et al. Effectiveness of chronic LHRH-analogue and 17 α -methyltestosterone therapy, administered at different times prior to

the spawning season, on the maturation of milkfish (*Chanos chanos*). **Aquaculture**, v. 70, p.159-167, 1988.

TAMARU, C. S. et al. Effects of chronic LHRH-a + 17-methyltestosterone or LHRH-a + testosterone therapy on oocyte growth in the striped mullet (*Mugil cephalus*). **General and Comparative Endocrinology**. v. 76, p. 114-127, 1989.

TAYLOR, R.G.; GRIER, H.J.; WHITTINGTON, J.A. Spawning rhythms of common snook in Florida. **Journal of Fish Biology**, v. 53, p. 502-520, 1998.

TAYLOR, G.T. et al. Age, growth, maturation, and protandric sex reversal in common snook, *Centropomus undecimalis*, from the east and west coast of South Florida. **Fishery Bulletin**, v. 98, p. 612-624, 2000.

VIDAL, B et al. Dopamine Inhibits Luteinizing Hormone Synthesis and Release in the Juvenile European Eel: A Neuroendocrine Lock for the Onset of Puberty. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1491–1500, 2004.

VOLPE, A.V. Aspects of the biology of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), of southwest Florida. **Florida State Board of Conservation Technical Series**, n. 31, 37 p., 1959.

WALLACE, R.A. et al. Preliminary observations on oocyte maturation and other aspects of reproductive biology in captive female snook, *Centropomus undecimalis*. **Aquaculture**, v. 116, p. 257- 273, 1993.

YARON, Z.; SIVAN, B. Reproduction. In: Evans, D.H., Clairbourne, J.B. (Eds.), **The Physiology of Fishes**. RC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, p. 343–386, 2006.

ZANUY, S. et al. Effects of sustained administration of testosterone in prepuberal sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. **Aquaculture**, v. 177, p. 21–35, 1999.

ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.367-373 2007

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

ANEXOS.

Figura 3. Canal de adução da Fazenda Ilha das Palmas, onde foram capturados alguns dos reprodutores utilizados neste estudo



Figura 4. Nova sala de maturação de reprodutores



Figura 5. Tanque de 36m³ utilizados no experimento



Figura 6. Incisão intraperitoneal para colocação do implante



Figura 7. Colocação do implante na incisão intraperitoneal, com auxílio de pinça.

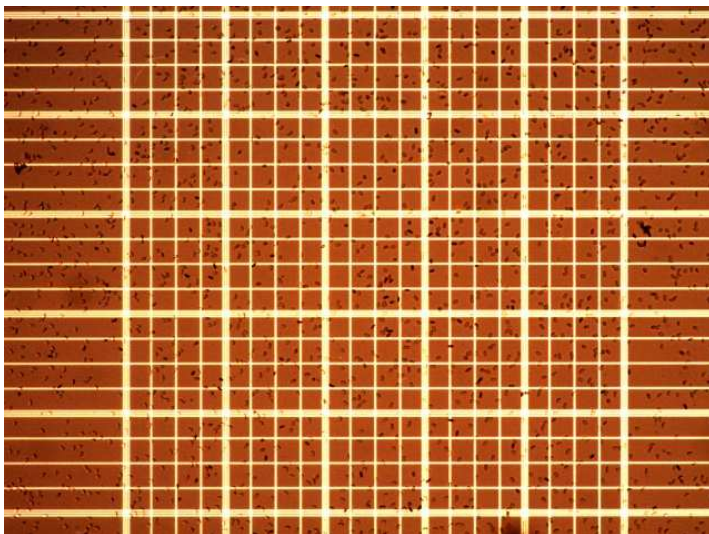


Figura 8. Esquema da contagem de eritrócitos na câmara de Neubauer

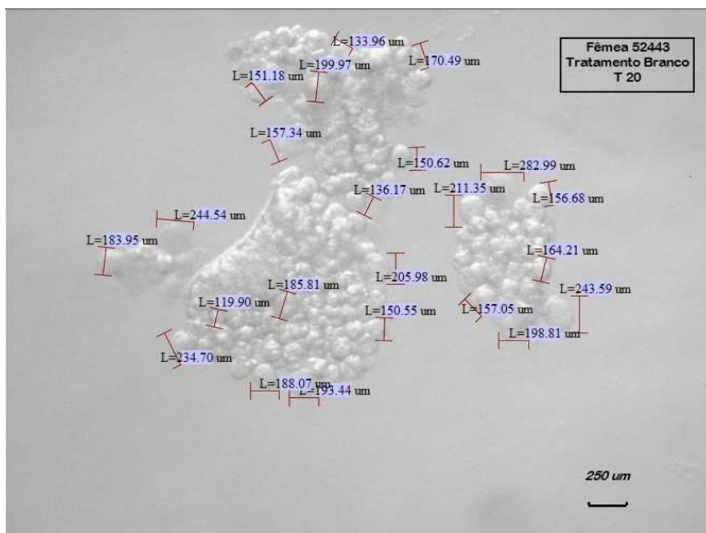


Figura 9. Contagem e mensuração dos ovócitos. Fêmea 52443 em T=20.

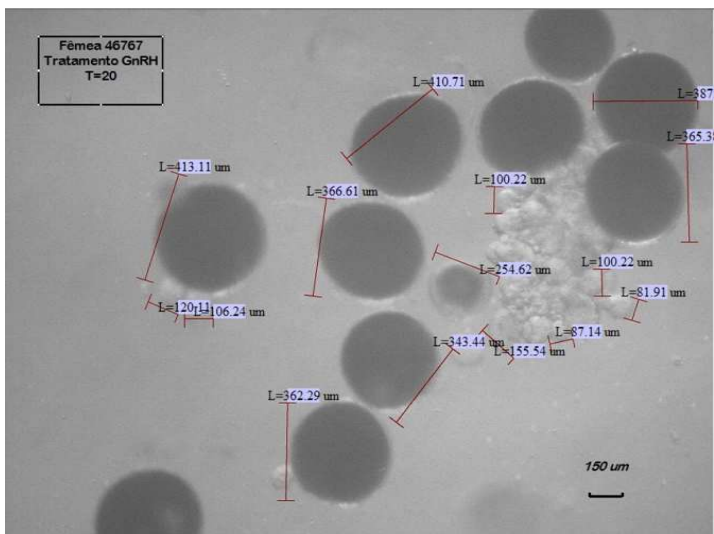


Figura 10. Contagem e mensuração dos ovócitos. Fêmea 46767 em T=20.

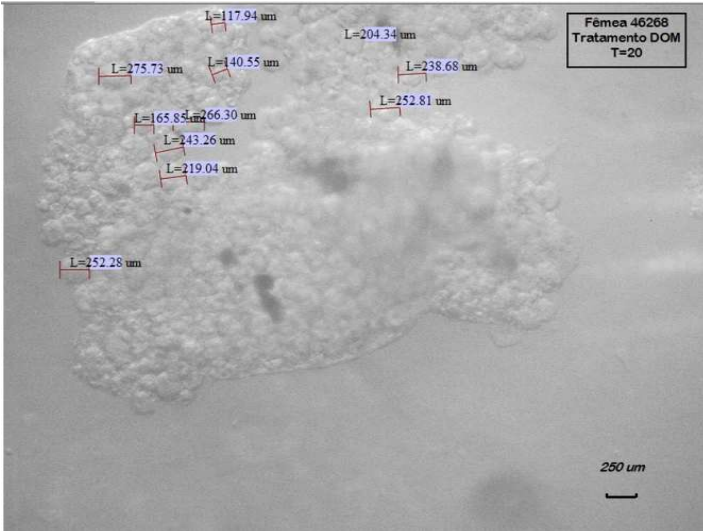


Figura 11. Contagem e mensuração dos ovócitos. Fêmea 46268 em T=20.

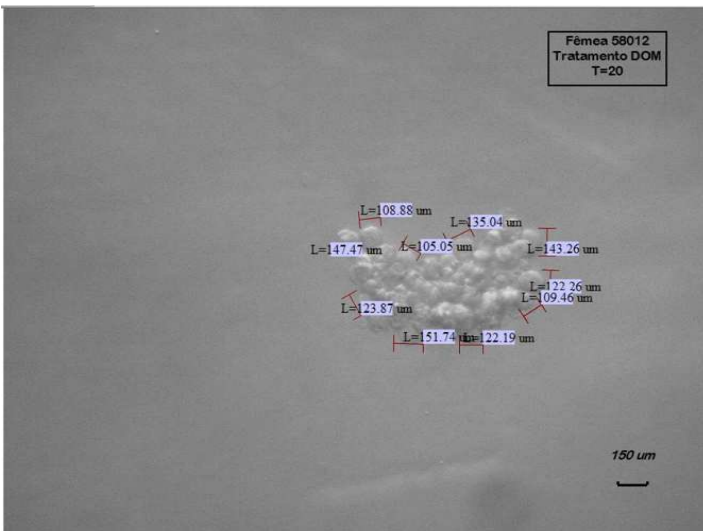


Figura 12. Contagem e mensuração dos ovócitos. Fêmea 58012 em T=20.

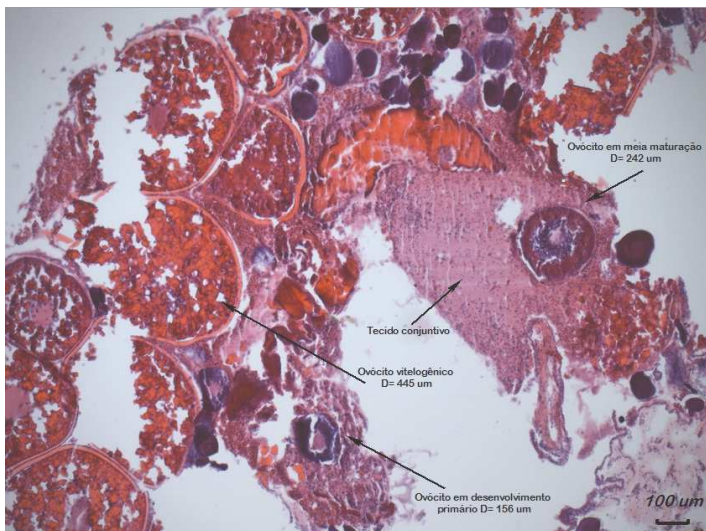


Figura 13. Análise histológica de biopsia ovariana. Fêmea 52443 em T=0. Aumento 100X. Barra indica 100um

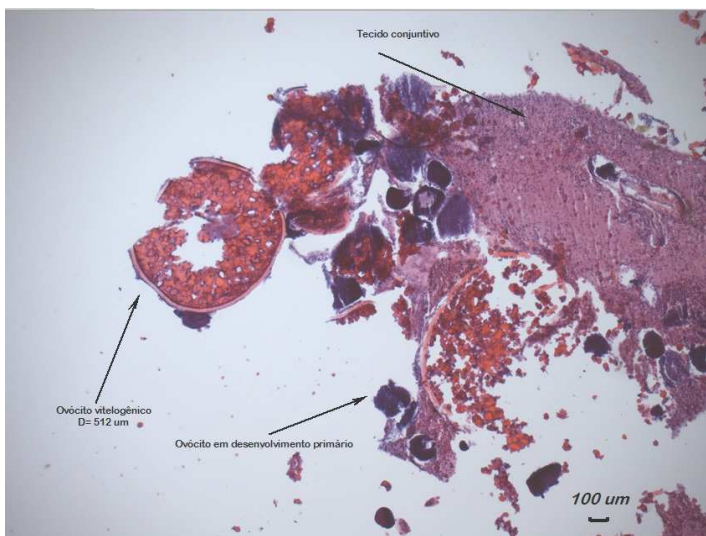


Figura 14. Análise histológica de biopsia ovariana. Fêmea 52443 em T=20. Aumento 100X. Barra indica 100um

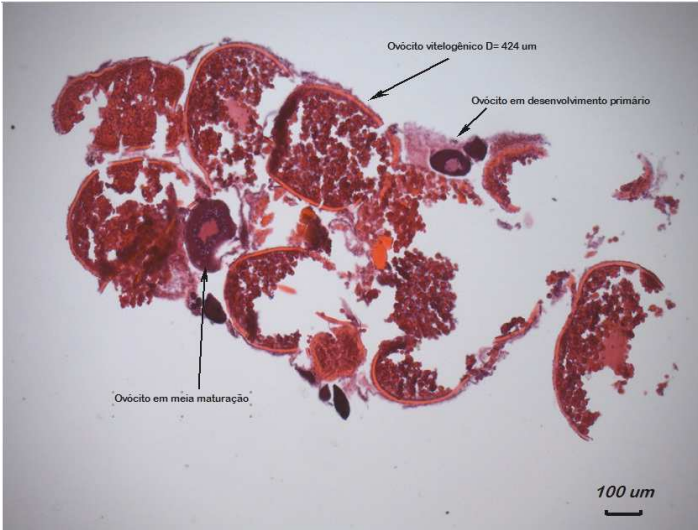


Figura 15. Análise histológica de biopsia ovariana. Fêmea 46767 em T=20. Aumento 100X. Barra indica 100 μ m

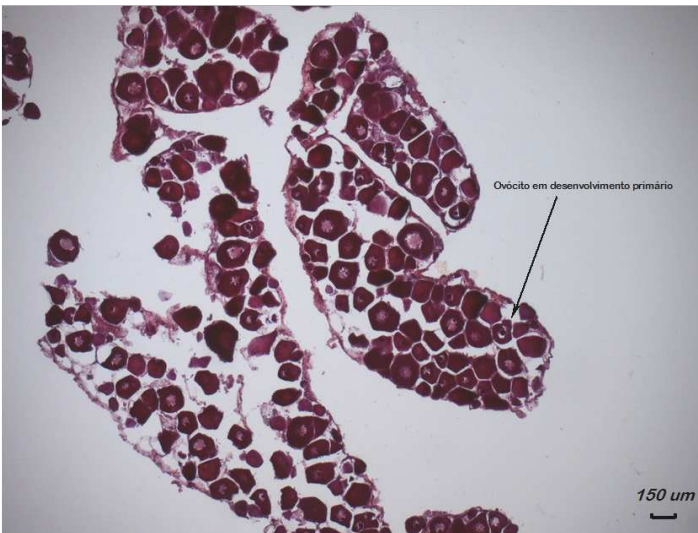


Figura 16. Análise histológica de biopsia ovariana. Fêmea 46268 em T=0. Aumento 100X. Barra indica 150 μ m



Figura 17. Análise histológica de biopsia ovariana. Fêmea 46268 em T=20. Aumento 100X. Barra indica 150um.

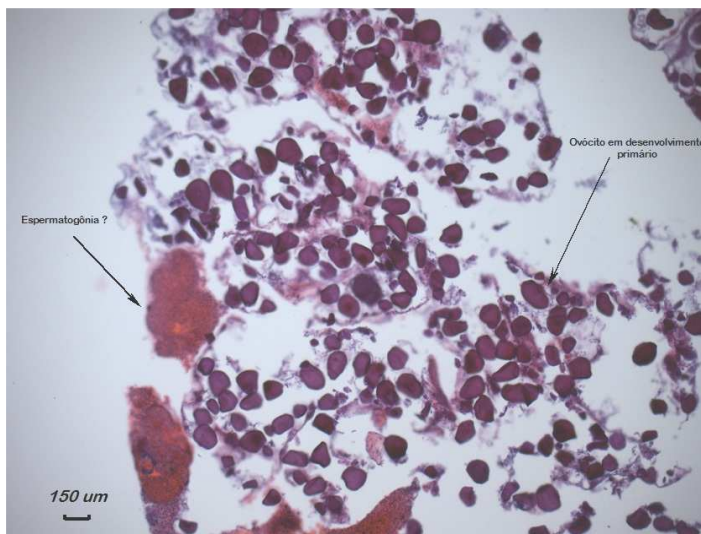


Figura 18. Análise histológica de biopsia ovariana. Fêmea 58012 em T=0. Aumento 100X. Barra indica 150um.

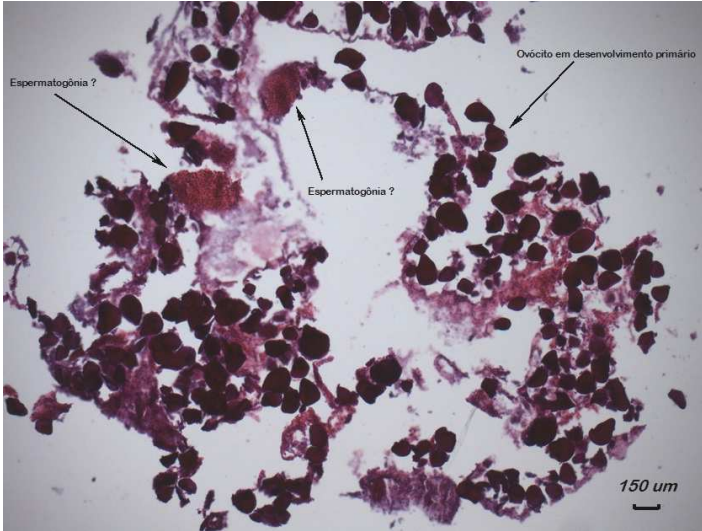


Figura 19. Análise histológica de biópsia ovariana. Fêmea 48916 em T=0. Aumento 100X. Barra indica 150um.



Figura 20. Análise histológica de biópsia ovariana. Fêmea 57905 em T=0. Aumento 100X. Barra indica 150um.

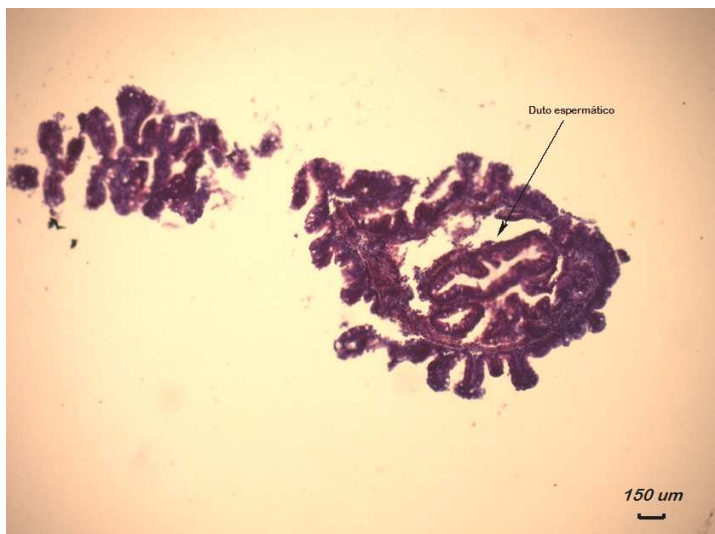


Figura 21. Análise histológica de biopsia em macho. Aumento 100X. Barra indica 150um.

4.8 TABELAS E GRÁFICOS NÃO UTILIZADOS NO ARTIGO

Tabela 1. Experimental Design

TAG	SEX	TREATMENT	SIZE (cm)	WEIGHT (g)
52443	FEMALE	BLANK	96	9862
48916	FEMALE	BLANK	88,5	7950
46194	MALE	BLANK	74	3900
54163	MALE	BLANK	54	2600
55504	MALE	BLANK	60	2300
F1	MALE	BLANK	65	2500
46767	FEMALE	GnRH	98	8150
57905	FEMALE	GnRH	86	6500
46342	MALE	GnRH	50	1200
51191	MALE	GnRH	50	1300
52025	MALE	GnRH	51	1500
45654	MALE	GnRH	54	2550
46268	FEMALE	GnRH + DOM	69	3000
58012	FEMALE	GnRH + DOM	73	4000
55769	MALE	GnRH + DOM	49	1260
51827	MALE	GnRH + DOM	51	1600
48142	MALE	GnRH + DOM	53	1600
49590	MALE	GnRH + DOM	49	1300

Tabela 2. Reproductive estate, gametes and erythrocytes number in T=0

CHIP	TREATMENT		T=0	
		REPROD STATE	GAMETES	ERITR x10 ⁶
52443	BLANK	MATURATION	242,02 ± 82 µm	2,83
48916	BLANK	UNDEFINED*	82 ± 13 µm	2,41
46194	BLANK	IMATURE	ABSENT	2,46
54163	BLANK	IMATURE	ABSENT	2,35
55504	BLANK	IMATURO	ABSENT	2,39
F1	BLANK	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,02
46767	GnRH	MATURATION	242,85 ± 104 µm	2,85
57905	GnRH	UNDEFINED*	81,18 ± 27 µm	1,77
46342	GnRH	IMATURE	ABSENT	2,17
51191	GnRH	IMATURE	ABSENT	3,63
52025	GnRH	IMATURE	ABSENT	2,69
45654	GnRH	IMATURE	ABSENT	2,23
46268	GnRH+DOM	PRE VITELLOGENIC	98,46 ± 17 µm	2,33
58012	GnRH+DOM	PRE VITELLOGENIC	93,21 ± 19 µm	2,56
55769	GnRH+DOM	IMATURE	ABSENT	3,30
51827	GnRH+DOM	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,53
48142	GnRH+DOM	IMATURE	ABSENT	2,42
49590	GnRH+DOM	IMATURE	ABSENT	2,32

* Fish classified as undefined, are those that at beginning of the experiment were classified as female, and after histological analysis of gonads, it became clear that possessed both primary development oocytes as spermatogonia.

Tabela 3. Reproductive estate, gametes and erythrocytes number in T=20

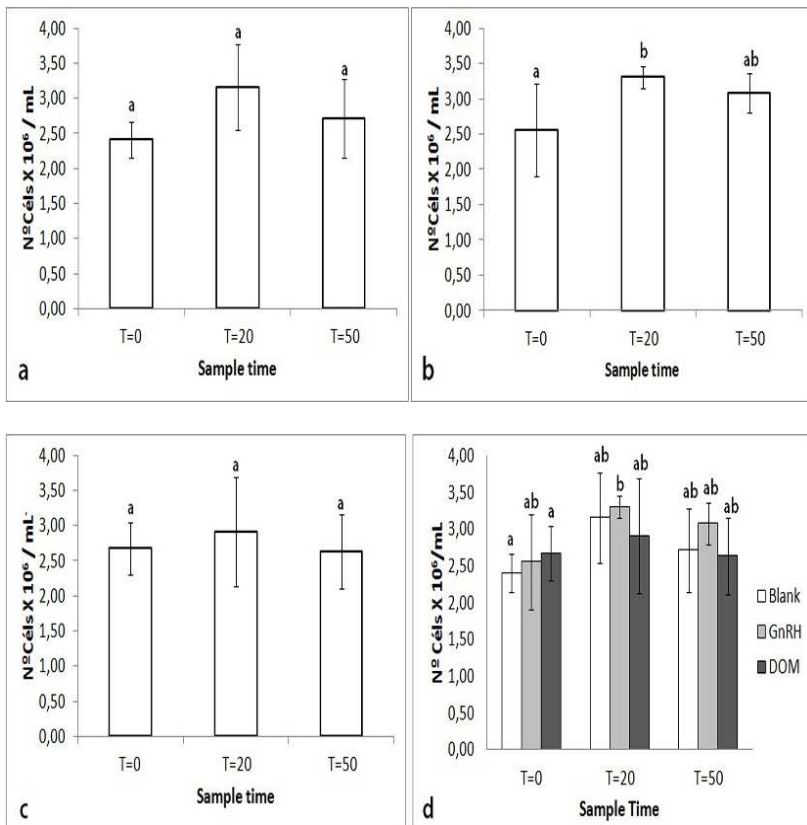
CHIP	TREATMENT	T=0		
		REPROD STATE	GAMETES	ERITR x10 ⁶
52443	BLANK	MATURATION	225,44 ± 77 µm	2,83
48916	BLANK	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,41
46194	BLANK	IMATURE	ABSENT	2,46
54163	BLANK	IMATURE	ABSENT	2,35
55504	BLANK	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,39
F1	BLANK	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,02
46767	GnRH	MATURATION	350,21 ± 86 µm	2,85
57905	GnRH	MATURATION	SPERM SIGNAL	1,77
46342	GnRH	IMATURE	ABSENT	2,17
51191	GnRH	IMATURE	ABSENT	3,63
52025	GnRH	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,69
45654	GnRH	IMATURE	ABSENT	2,23
46268	GnRH+DOM	PRE VITELLOGENIC	169,35 ± 21 µm	2,33
58012	GnRH+DOM	PRE VITELLOGENIC	145,92 ± 27µm	2,56
55769	GnRH+DOM	MATURATION	SPERM SIGNAL	3,30
51827	GnRH+DOM	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,53
48142	GnRH+DOM	IMATURE	ABSENT	2,42
49590	GnRH+DOM	IMATURE	ABSENT	2,32

Tabela 4. Reproductive estate, gametes and erythrocytes number in T=50

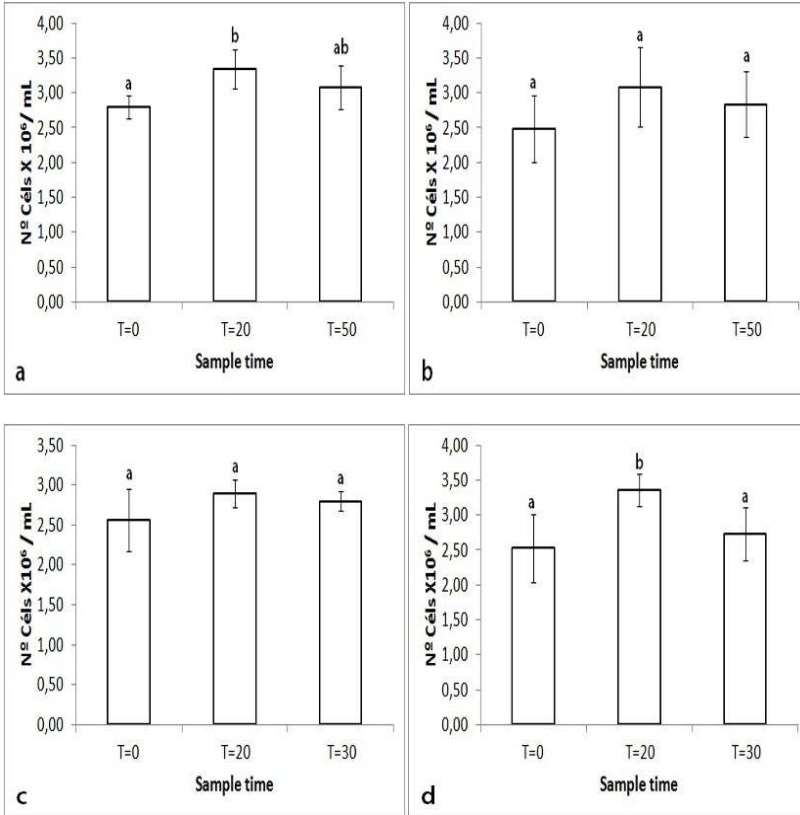
CHIP	TREATMENT	T=0		
		REPROD STATE	GAMETES	ERITR x10 ⁶
52443	BLANK	MATURATION	209,23 ± 69 µm	2,83
48916	BLANK	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,41
46194	BLANK	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,46
54163	BLANK	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,35
55504	BLANK	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,39
F1	BLANK	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,02
46767	GnRH	MATURATION	344,83 ± 122 µm	2,85
57905	GnRH	MATURATION	SPERM SIGNAL	1,77
46342	GnRH	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,17
51191	GnRH	MATURATION	SPERM SIGNAL	3,63
52025	GnRH	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,69
45654	GnRH	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,23
46268	GnRH+DOM	PRE VITELLOGENIC	170,69 ± 28 µm	2,33
58012	GnRH+DOM	PRE VITELLOGENIC	141,8 ± 30µm	2,56
55769	GnRH+DOM	MATURATION	SPERM SIGNAL	3,30
51827	GnRH+DOM	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,53
48142	GnRH+DOM	MATURATION	SPERM SIGNAL	2,42
49590	GnRH+DOM	IMATURE	ABSENT	2,32

Tabela 5. Qualitative and quantitative analysis of the semen at the end of experiment.

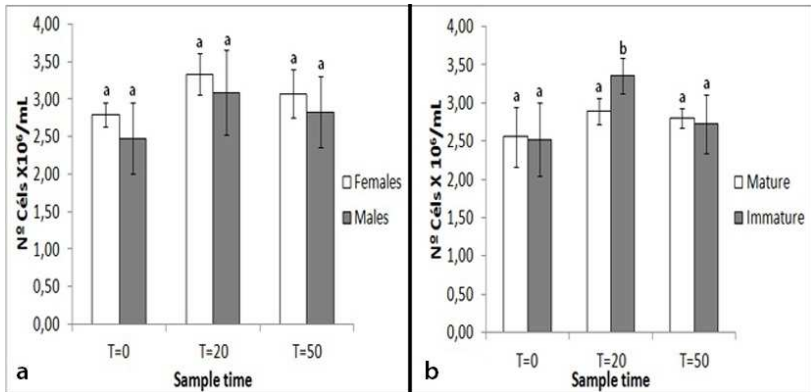
CHIP	TREATMENT	FINAL		
		VOLUME (μ L)	MOTILITY TIME (S)	MOTILITY
48916	BLANK	60	192	CLASS 4
46194	BLANK	80	190	CLASS 4
54163	BLANK	40	221	CLASS 4
55504	BLANK	100	216	CLASS 4
F1	BLANK	60	212	CLASS 4
57905	GnRH	70	161	CLASS 4
46342	GnRH	60	267	CLASS 4
51191	GnRH	80	178	CLASS 4
52025	GnRH	80	140	CLASS 4
45654	GnRH	100	196	CLASS 4
55769	GnRH + DOM	80	229	CLASS 4
51827	GnRH + DOM	150	200	CLASS 4
48142	GnRH + DOM	60	169	CLASS 4
49590	GnRH + DOM	ABSENT	ABSENT	CLASS 4



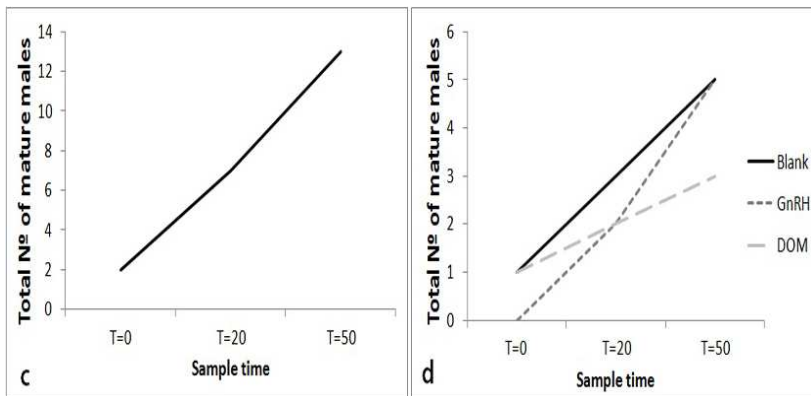
Total number of erythrocytes X 10⁶ / mL. a- Blank treatment; b- GnRH treatment; c- DOM treatment; d- between treatments. Different letters mean statistical difference.



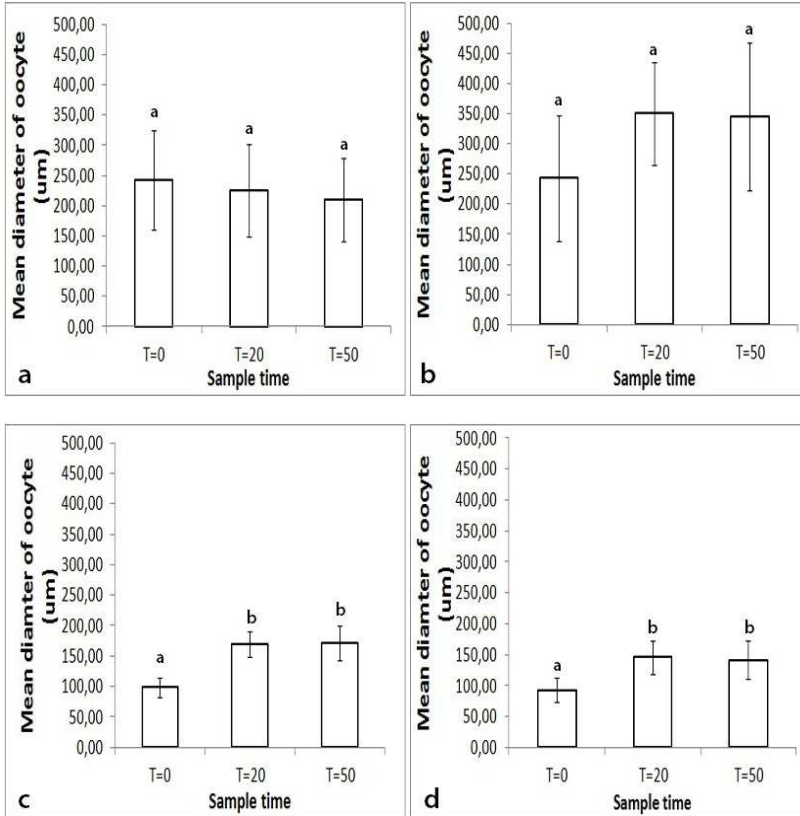
Total number of erythrocytes $\times 10^6 / \text{mL}$. a- females; b- males; c- mature; d- immature. Different letters mean statistical difference.



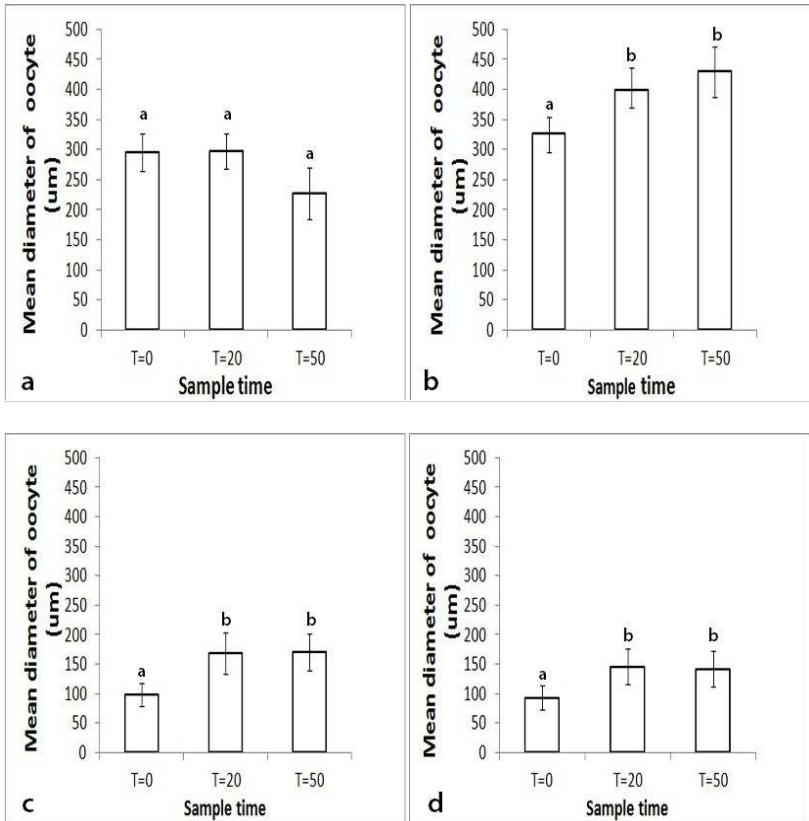
Total number of erythrocytes X 10⁶ / mL. a- between females and males; b- between mature and imatures Different letters mean statistical difference.



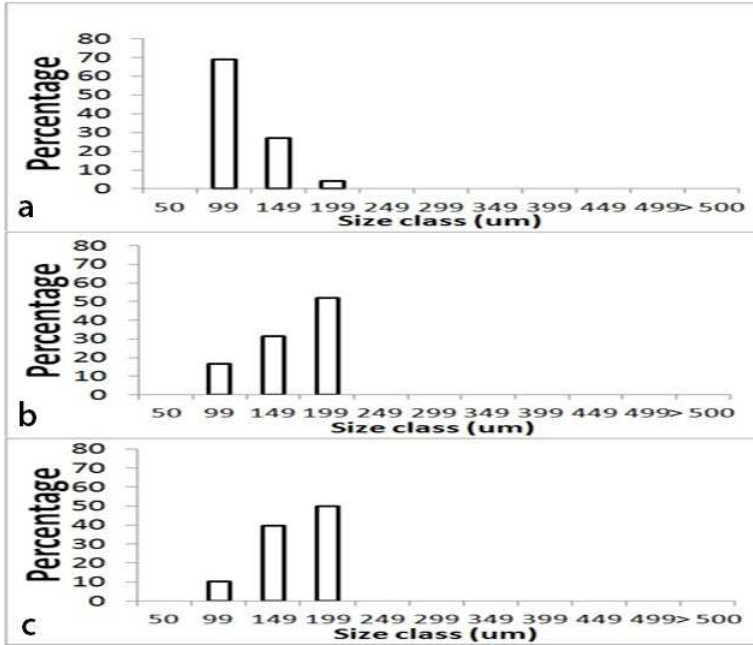
Total number of mature males; d- Total number of mature males per treatment.



Mean diameter of total oocytes in each female throughout the experiment. a- female 52443; b- female 46767; c- female 46268; d- female 58012. Different letters mean statistical difference.



Mean diameter of last batch oocytes in each female throughout the experiment. a- female 52443; b- female 46767; c- female 46268; d- female 58012. Different letters mean statistical difference.



Frequency of oocytes in treatment Blank female. a- T0; b- T20; c- T50