



* B R 1 0 2 0 2 1 0 1 8 3 3 0 A 2 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021018330-6 A2

(22) Data do Depósito: 15/09/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
28/03/2023

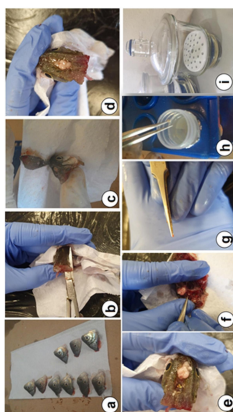
(54) **Título:** OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE HIPÓFISE DE ASTYANAX ALTIPARANAE PARA USO NA REPRODUÇÃO INDUZIDA DE PEIXES

(51) **Int. Cl.:** A61K 35/60; A61P 5/24.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** SERGIO RICARDO BATLOUNI; LAÍZA MARIA DE JESUS SILVA; MARIANA ROZA DE ABREU.

(57) **Resumo:** OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE HIPÓFISE DE ASTYANAX ALTIPARANAE PARA USO NA REPRODUÇÃO INDUZIDA DE PEIXES. O presente pedido de patente de invenção descreve o primeiro protocolo de obtenção de extrato bruto de glândula pituitária de lambari, *Astyanax altiparanae*, (EBHL) eficaz para induzir a reprodução de peixes em cativeiro. Definimos aqui as condições específicas e inéditas para a manutenção dos lambaris em viveiros escavados com o objetivo de obter um extrato eficaz, são elas: época do ano em que os peixes devem ser estocados; o período de armazenamento dos peixes; as dimensões dos viveiros escavados; e a densidade populacional e fluxo de água. Para isso, 10 viveiros escavados (81m³: 9m x 6m x 1,5m) foram usados e inicialmente 2500 espécimes de lambari adultos (fêmeas e machos) foram distribuídos igual e aleatoriamente (n = 250 espécimes por tanques de terra), de modo que a densidade foi de 3,08 peixes / m³. Para avaliar a eficácia do EBHL obtido em dois períodos após o povoamento dos viveiros, testamos inicialmente seu uso na reprodução induzida do próprio lambari. O EBHL promoveu a desova na própria espécie, entretanto, concluímos que o lambari não é um bom modelo experimental para testes de indução hormonal, uma vez que animais não injetados (controle (...)).



OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE HIPÓFISE DE *ASTYANAX ALTIPARANAE* PARA USO NA REPRODUÇÃO INDUZIDA DE PEIXES

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente de invenção refere-se à obtenção de extrato bruto de hipófise de *Astyanax altiparanae*, visando o seu uso na reprodução induzida de peixes.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] O presente pedido de patente de invenção pode ser aplicado para o uso do extrato na indução hormonal de espécies de peixes produzidos em cativeiro, assim valorizando um produto nacional com oferta regular das hipófises, podendo ser utilizado por produtores de alevinos de peixes migradores tropicais do Brasil e de várias outras espécies produzidas em diversos países do mundo. Pode ser aplicada às áreas de Agricultura e de saúde animal.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] O método da hipofisação permitiu um avanço notável e consolidação da produção de peixes migradores tropicais, grupo que inclui, por exemplo, o tambaqui, a segunda espécie mais produzida no Brasil. O método foi proposto por Houssay em 1930 na Argentina e estudos subsequentes foram desenvolvidos no Brasil por Von Ihering em 1935 (HOUSSAY, 1930; VON IHERING, 1937; ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007) com a aplicação de hipófises frescas provenientes de peixes maduros (DONALDSON; HUNTER, 1983). Ambos os pesquisadores obtiveram sucesso com o desenvolvimento da técnica, denominada de hipofisação (ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007).

[004] Até o momento atual, os métodos de indução hormonal avançaram com produtos sintéticos que gradativamente substituíram a hipofisação para algumas espécies, no entanto a hipofisação com uso de hipófise de carpa (EBHC) ainda responde pela ampla maioria da técnica na reprodução induzida de peixes no Brasil. A técnica viabilizou a produção destas espécies, uma vez que a reprodução passou a ser induzida em laboratório, e os produtores passaram a não depender mais da captura de animais em ambiente natural.

[005] Assim, na maioria das pisciculturas utiliza-se EBHC devido a facilidade de obtenção e simplicidade da técnica (ANDRADE e YASUI, 2003) sendo uma técnica amplamente utilizada (DONALDSON e HUNTER, 1983; BALDISSEROTTO, 2013), na qual utilizam-se hipófises frescas ou dessecadas, e não necessita de refrigeração. No entanto, o EBHC é obtido de uma espécie exótica *Cyprinus carpio* sendo um produto importado, de alto custo e comercializado em moeda internacional (STREIT JR., 2003; MURGAS *et al.*, 2011). Assim, considerando o preço elevado somado a sua frequente falta no mercado, devido à sazonalidade da produção e oferta, é fundamental definir protocolos alternativos ou para substituição do EBHC (SOUZA *et al.*, 2003).

[006] Em consonância, destaca-se que o Brasil apresenta uma lista de mais de 15 espécies nativas que já possuem dados de produção oficiais relatados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018), as quais poderiam ser potenciais doadores de hipófises para produção e um extrato alternativo ao EBHC. Esta possibilidade proporcionaria ao produtor agregar valor ao seu produto, além de minimizar os gastos de produção, reduzindo o custo de importação com compra de insumos como o EBHC (MOULIN, 2011).

[007] Atualmente, o lambari vem conquistando importância na aquicultura comercial, devido ao bom desempenho zootécnico e resistência, ao baixo índice de mortalidade e ao manejo simples (NAVARRO *et al.*, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2014). Também pela rusticidade, por apresentar ciclo reprodutivo curto (em torno de 5 meses) e alta produtividade quando cultivado em sistema intensivo (GARUTTI, 2003) tornou-se um excelente candidato para ser explorado como doador de hipófise para ser aplicada na reprodução de espécies pequeno porte, como o próprio lambari, médio e grande porte, como curimba e tambaqui.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[008] Apesar do método de extração da hipófise já ser comprovado e a eficiência do uso de extrato já ser conhecida (CRISCUOLO-URBINATI *et al.*, 2012; HAINFELLNER *et al.*, 2012; VIVEIROS *et al.*, 2013; KURADOMI; FORESTI; BATLOUNI, 2017; KURADOMI; BATLOUNI; 2018; PEREIRA *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018), a proposta

desse pedido de patente de invenção é estabelecer uma metodologia a ser aplicada na produção comercial de lambari que permitisse ao produtor não só obter o peixe para venda da carne, mas como também explorar a retirada da hipófise para produzir e vender o extrato. Para isso nesta proposta estabelecemos um manejo específico garantindo que o extrato obtido possa ser utilizado para indução de outras espécies, pois sabidamente as hipófises precisam ser coletadas em período específico no qual contenham quantidades elevadas de hormônios indutores a reprodução. Para isso, os peixes doadores precisam ser mantidos em unidades experimentais, época do ano e com a densidade de estocagem específicos, para que o extrato tenha a capacidade de induzir outros exemplares a reprodução; e foi exatamente isso que obtivemos com o lambari e estamos submetendo para avaliação.

[009] Os objetivos do presente pedido de patente de invenção são:

- estimular a aquicultura nacional;
- reduzir custos de produção de alevinos;
- fomentar o cultivo de peixes nativos;
- aumentar a renda e oferecer outra fonte de renda para pequenos produtores de lambari.

[010] Neste contexto, o objetivo foi testar uma espécie nativa de pequeno porte que vem ganhando destaque na aquicultura nacional, o lambari (*Astyanax altiparanae*), cuja produção nacional aumentou mais de 130% de 2016 (234,7 toneladas) para 2017 (548,8 toneladas) e em 2018 a taxa de crescimento da produção continuou a crescer (595,6 toneladas), ultrapassando em taxa de crescimento de produção da tilápia, espécie mais produzida no país (IBGE, 2018). Em 2019 foram contabilizados 23.028 estabelecimentos tornando a 4ª espécie mais presente nas pisciculturas brasileiras (Peixe BR, 2020). Considerado de pequeno porte, esta espécie pode atingir 60 g e 10 a 15 cm de comprimento (PORTO-FORESTI *et al.*, 2018) e se destaca pelas diversas finalidades de seu cultivo, como a utilização de isca viva na pesca esportiva ou lazer, como peixe forrageiro para espécies carnívoras; em menor escala é usado no aquarismo, como peixe ornamental e na alimentação (fonte de proteína animal com boa aceitação) (GARUTTI, 2003), tem potencial de comercialização no mercado de

enlatados (FERREIRA *et al.*, 2014) considerado como um grande candidato a substituição da sardinha (*Sardinella* spp.), assim reduzindo a pressão sobre os estoques pesqueiros (SUSSEL, 2015; VALLADÃO *et al.*, 2016).

PROBLEMÁTICA

[011] A reprodução de peixes migradores nativos em cativeiro só é obtida mediante indução hormonal. O principal método utilizado é a hipofisação com EBHC, produto com preço altamente elevado (R\$ 1500,00 um grama), importado e que eleva muito o custo de produção de alevinos. O extrato de hipófise de lambari pode ser produzido pelo produtor (pequeno ou grande) com pouco investimento em primeiro lugar reduzindo custos de produção de alevinos, uma vez que as cabeças dos peixes são descartadas ou ocasionalmente usadas como co-produtos.

[012] Além de agregar valor na produção, o extrato importado, além de caro, muitas vezes não possui autorização de comercialização por órgãos de vigilância sanitária e em alguns lugares e períodos não estão disponíveis no mercado. O extrato importado também é vendido em quantidades maiores e muitas vezes, estraga ou envelhece perdendo sua capacidade biologicamente ativa. Se produzido pelo próprio produtor permite que o estoque seja renovado de acordo com a necessidade do mesmo.

[013] Neste contexto, o uso do EBHL poderia ser uma alternativa para uso da hipofisação convencional, diminuindo a importação da EBHC. O EBHC é obtido de uma espécie exótica, a carpa, que atinge a maturidade sexual em torno de 4 anos de idade, período em que indicado para extração das hipófises enquanto o lambari pode ser retirado aos 4 meses de idade. Por isso, como alternativa o protocolo apresentado nesse pedido de patente de invenção propõe o uso de hipófise de uma espécie nativa, o lambari, valorizando um produto nacional e incentivando a produção aquícola brasileira.

[014] Por fim a demanda por produção de EBHL pode induzir a produção de mais um produto da aquicultura nacional e ser consumido no Brasil e no mundo, ajudando a impulsionar a cadeia produtiva nacional e gerando demanda e recursos para pesquisas com o próprio extrato, tais como: níveis de pureza, quantidade de LH por extrato,

validade do produto. Todas estas pesquisas tornariam o produto ainda mais atrativo, mas precisam de recursos para serem executadas.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO E DAS FIGURAS

[015] O presente pedido de patente de invenção será melhor explicado através da descrição detalhada da invenção:

[016] Obtenção e teste do primeiro lote de extrato bruto de hipófise de lambari (EBHL):

O primeiro lote de extrato foi obtido para o teste da indução a desova na própria espécie. Este primeiro experimento foi realizado para avaliar e comparar a eficiência do extrato obtido coletando as hipófises no mês de outubro e no mês de dezembro. Para a avaliação das características reprodutivas dos animais estocados ao longo do experimento, cinco fêmeas (uma de cada viveiro) foram amostradas no mês de outubro e mais cinco no mês de dezembro. Destas fêmeas, foram coletadas a hipófise, amostras de sangue e os ovários. O sangue foi coletado dos vasos caudais em seringas heparinizadas, centrifugadas a 1500×g por 15 min a 4°C e o plasma foi armazenado em ultra freezer (-80°C) para análise dos níveis plasmáticos de esteroides sexuais pelo método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Os ovários foram utilizados para o cálculo do índice gonadossomático (IGS):

[IGS = (massa das gônadas/massa corpórea) x 100]

Equação 1

[017] Fragmentos ovarianos também foram fixados para análise histológica e análise de densidade volume dos componentes celulares (análise estereológica) com a finalidade de avaliar o estágio do ciclo reprodutivo. Este mesmo procedimento foi realizado no mês de dezembro.

[018] O IGS médio e os níveis plasmáticos de E₂ e 17, 20 β-P das fêmeas doadoras de outubro e dezembro foram similares. As densidades volumétricas ocupadas pelos diferentes tipos de oócitos (análise estereológica dos ovários) foram similares entre os ovários coletados em outubro e em dezembro. Além disso, a maioria dos oócitos (cerca de 70%) foram classificados como vitelogênicos finais (oócitos maduros que não sofreram maturação final) e não foram observados folículos pós-ovulatórios (estruturas

remanescentes que permanecem nos ovários após a desova) mostrando que os animais amostrados não haviam desovado, pelo menos recentemente, nos viveiros. Estes dados indicaram que nas condições de manejo aplicadas, as fêmeas estavam com ovários maduros, não haviam desovado e, portanto, potencialmente aptas para terem suas hipófises coletadas para produção do extrato tanto no mês de outubro como no mês de dezembro.

[019] Experimento 1 - Testes da eficácia do primeiro lote de EBHL para reprodução da própria espécie *A. altiparanae*: Para avaliar a eficácia do protocolo de coleta do EBHL inicialmente testamos seu uso no próprio lambari. Para isso, foram utilizadas unidades experimentais constituídas por caixas plásticas de 10 litros (30 X 40 cm) com 5 fêmeas e 10 machos (proporção de 1:2) com fluxo contínuo de entrada e saída de água e com um coletor de ovos na saída de água composto por uma malha de 0,5 mm em sistema seminatural com recirculação fechada e utilizados cinco unidades para cada grupo.

[020] Os seguintes tratamentos foram aplicados:

Extrato bruto de hipófise de lambari coletado em outubro (OUT) (n=25)

Extrato bruto de hipófise de lambari coletado em dezembro (DEZ) (n=25)

Extrato bruto de hipófise de carpa – controle positivo (CP) (n=25)

Solução salina de 0,9% de NaCl – controle negativo (C) (n=25)

[021] Nos grupos OUT, DEZ e CP foi administrada a dosagem única de 6 mg. Kg⁻¹ do respectivo extrato, exceto no grupo controle que recebeu volume igual de solução salina. O extrato foi diluído em solução salina e aplicado por meio de injeção intraperitoneal. Nos machos de todos os grupos, exceto no grupo controle negativo, foi aplicado de 3 mg. Kg⁻¹ de CP. O volume de injetado foi de 0,1mL.10g⁻¹. Os animais foram induzidos as 00h00 e CP foi obtido de fornecedores comerciais.

[022] Ao término do experimento foram coletadas uma fêmea desovada e uma fêmea não desovada de cada unidade experimental. Para efeito de comparação, um grupo basal foi estabelecido e determinado como grupo inicial (IN) com a coleta de cinco fêmeas não induzidas no início do experimento. Decorridos 5 horas após a indução hormonal (05h00), os animais foram monitorados com intervalos de 30 minutos para

observação de desova, quando desovada aguardamos 30 minutos e então aferido o volume dos ovos e em seguida colocados em incubadoras cônicas de 8 litros. O experimento foi analisado por meio das variáveis apresentadas na Tabela 1.

[023] Desempenho reprodutivo comparando o extrato de hipófise lambari de outubro e dezembro e demais grupos: As variáveis analisadas neste experimento foram descritas abaixo, não foi possível análise estatística pelo baixo número de unidades desovadas (Tabela 2).

Tabela 1. Avaliação dos parâmetros reprodutivos:

Variáveis	Cálculo
Horas-grau	HG= somatória da temperatura medida a cada hora entre a indução hormonal e desova
Taxa de desova	TD= número total de réplicas desovadas/ número total de réplicas por grupo
Número de fêmeas desovadas por réplica	TD= número de fêmeas desovadas/ número total de fêmeas por réplica
Volume de ovos por réplica	V=volume total de ovos em cada réplica
Fecundidade relativa média	FR = volume total de ovos/ soma total de massa das fêmeas desovadas por grupo
Taxa de fertilidade	TF = número de ovos viáveis x 100/ número total de ovos
Taxa de eclosão	TE = número de larvas eclodidas x 100/ número total de ovos
Número de embriões viáveis	N= volume de desova x taxa de eclosão x 720 ovos por mL.

[024] Na tabela 2, é possível observar que a taxa de desova entre a hipofiseção convencional (CP) com extrato bruto de hipófise de carpa foi similar ao extrato bruto de hipófise lambari obtido em outubro e dezembro.

[025] Apesar de promissores, este primeiro experimento estava longe de ser conclusivo, pois as taxas de desova foram baixas em todos os tratamentos impedindo a realização de testes estatísticos.

Tabela 2. Experimento 1. Desempenho reprodutivo com dose única de 6mg.Kg^{-1} de OUT, DEZ, CP e C (0,9%NaCl) em fêmeas de *A. altiparanae*. Abreviações: controle negativo (C), controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ).

Grupos	Horas grau	Taxa de desova	Volume		
			de ovos por réplica (mL)	Taxa de fertilidade (%)	Taxa de eclosão (%)
C	208,8	20%	20	85,6	97,1
CP	279,7	40%	17	51,1	55,3
	232,2		12	5	7,56
OUT	182,7	40%	56	43,1	48,9
	156,6		45	51	7,7
DEZ	156,6	40%	42	46,1	53,7

[026] Experimento 2: confirmatório sobre uso de EBHL na própria espécie: O experimento foi repetido e obteve-se os resultados. Assim como foi observado no experimento 1, o grupo inicial (IN) tinha apenas oócitos vitelogênicos e não possuíam folículos pós ovulatórios, sendo assim os animais estavam em um estágio reprodutivo ideal para indução hormonal. No experimento 2, observamos que o uso de OUT e DEZ promoveu a desova nos grupos experimentais, mas novamente não foi possível realizar análise estatística entre os grupos, pois exceto no grupo OUT, a taxa de desova foi relativamente baixa entre os demais grupos (Tabela 3). Assim, apesar do EBHL tanto de outubro como de dezembro propiciar taxas desovas novamente similares ou superiores ao CP, ajustes no protocolo precisariam ser desenvolvidos para termos resultados conclusivos. Assim optamos por fazer um novo experimento alterando apenas uma das variáveis para todos os tratamentos que foi mudar o protocolo de dose única para dose fracionada.

Tabela 3. Experimento 2. Desempenho reprodutivo com dose única de 6mg. Kg^{-1} de CP, OUT, DEZ e C (0,9% NaCl) em *A. altiparanae*. Abreviações: controle negativo (C), controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em

outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ).

Grupos	Horas-grau	Taxa de desova	Volume de ovos por réplica (mL)	Taxa de fertilidade (%)	Taxa de eclosão (%)
C	203,9	20%	30	70,4	79,3
CP	261,5	20%	4	0	0
OUT	234,9	80%	35	87,2	72,8
	341,3		4	42,8	29,4
	316,9		36	51,2	41,8
	230,5		14	27	24,9
DEZ	150,7	20%	42	46,1	53,7

[027] Experimento 3: Avaliação do fracionamento da dose total de EBHL para otimização na reprodução na própria espécie: Os dois experimentos anteriores (Exp. 1 e Exp 2), nos quais usou-se doses únicas para todos os tratamentos, mostraram uma taxa de ovulação relativamente baixa para maior parte todos dos tratamentos e com elevada heterogeneidade e inconsistência entre réplicas de um mesmo tratamento. Estes aspectos nos fizeram considerar uma mudança no protocolo e fracionar a dose do extrato. O lambari é uma das raras espécies onde se aplica uma única dose de hipofisacção, mas não existem estudos que suportam cientificamente este protocolo. Futuramente, esta observação daria origem a uma publicação científica onde demonstramos que o lambari responde melhor a doses fracionadas (Roza de Abreu *et al.*, 2020. *Aquaculture Research in press*), o que sedimentou a modificação efetuada. A hipofisacção é amplamente administrada em doses fracionadas por razões já comprovadas cientificamente. Sabe-se que a dose inicial capacita os oócitos a responderem positivamente ao LH administrado e que também o fracionamento da dose possibilita elevações nos níveis de esteroides como o DHP (refletindo em melhores resultados) que não são observadas quando se aplica dose única. Estes dados foram mostrados para diversas espécies e podem ser também uma realidade

não conhecida para o lambari. Por estas razões, optamos por fracionar doses e testar novamente o EBHL.

[028] Para isso, foram utilizadas as mesmas unidades experimentais e os seguintes tratamentos em doses fracionadas, com 12 horas de intervalo entre as doses:

- Extrato bruto de hipófise de lambari coletado em outubro (OUT) (n=25)
- Extrato bruto de hipófise de lambari coletado em dezembro (DEZ) (n=25)
- Extrato bruto de hipófise de carpa – controle positivo (CP) (n=25)
- Solução salina de 0,9% de NaCl – controle negativo (C) (n=25)
- Controle sem manipulação hormonal, no qual machos e fêmeas não receberam aplicação hormonal, apenas receberam o mesmo manejo e foram alocados nas caixas no mesmo horário dos demais grupos (CC) (n=25).

[029] Nos grupos OUT, DEZ e CP foram administradas $0,6 \text{ mg. Kg}^{-1}$ na primeira dose e $5,4 \text{ mg. Kg}^{-1}$ na segunda dose (10% + 90%) do respectivo extrato. O extrato foi diluído em solução salina e aplicado por meio de injeção intraperitoneal. O grupo controle negativo (C) recebeu volume igual de solução salina no momento das doses dos outros tratamentos. Nos machos de todos os grupos, exceto no grupo CC, foi aplicado de 3 mg. Kg^{-1} de CP no momento da segunda dose das fêmeas. O volume de injetado foi de $0,1 \text{ mL. } 10 \text{ g}^{-1}$. Para avaliar o efeito dos tratamentos foi realizada uma coleta de fêmeas não induzidas, no início do experimento denominado grupo inicial (IN). Decorridos 5 horas após a segunda dose hormonal, os animais foram monitorados com intervalos de 30 minutos para observação de desova. Quando a desova era detectada, o volume de ovos era calculado e em seguida, os ovos eram colocados em incubadoras cônicas de 8 litros. O experimento 3 foi analisado por meio das mesmas variáveis usadas nos experimentos 1 e 2 (Tabela 1)

[030] Experimento 3 – Dose fracionada (resultados): O fracionamento das doses de EBHL melhorou significativamente a taxa de desova com uso de EBHL com resposta de 100% com o extrato obtido em OUT e DEZ (Tabela 4). Os controles C e CP tiveram apenas 20% e 60% de taxa de desova e que CC não apresentou desova. Em todas as variáveis de desempenho reprodutivo, avaliadas os tratamentos com extrato de hipófise de lambari apresentaram resultados similares ao controle positivo (hipófise de carpa).

Devido as baixas taxas de ovulação do controle negativo não foi possível incluí-lo nas análises estatísticas.

Tabela 4. Experimento 3. Doses Fracionadas. Desempenho reprodutivo de fêmeas de *A. altiparanae* induzidas com dose fracionada de 6mg.Kg^{-1} de CP, OUT, DEZ e C (0,9% NaCl). **Abreviações:** controle negativo (C), controle sem manipulação hormonal (CC), controle positivo (CP), extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em dezembro (DEZ).

Grupos	Horas-grau	Taxa de desova	Nº de fêmeas desovadas em cada réplica**	Volume de ovos por grupo (ml)	Fecundidade de relativa média	Taxa de fertilidade (%)	Taxa de eclosão (%)	Nº de embriões viáveis
C	150,7	20%	0-0-0-1-1 ^a	20	0,251	73,63	70	10944
CC	-	-	0-0-0-0-0 ^a	-	-	-	-	-
CP	185,8 ± 43,7 ^a	60%	0-0-1-2-2 ^b	24,8 ± 14,5 ^a	0,35 ± 0,2 ^a	74,7 ± 11,7 ^a	74,0 ± 7,5 ^a	13633,9 ± 8409,0 ^a
OUT	189,7 ± 41,2 ^a	100%	1-1-1-2-2 ^b	20,7 ± 8,6 ^a	0,25 ± 0,08 ^a	42 ± 40,5 ^a	41,2 ± 4,2 ^a	4933,1 ± 771,3 ^a
DEZ	177,3 ± 38,4 ^a	100%	1-2-2-2-3 ^b	34,1 ± 10,8 ^a	0,46 ± 0,13 ^a	73,6 ± 15,3 ^a	65,3 ± 20,3 ^a	16071,2 ± 6610,8 ^a

**Para análise estatística de horas-grau, volume de ovos por grupo, fecundidade relativa média, taxas de fertilidade e eclosão e número de embriões viáveis foram consideradas apenas réplicas com desovas. Os grupos C e CC não foram incluídos nas análises estatísticas, exceto para o nº de fêmeas desovadas em cada réplica.

[031] O experimento 3 tornou mais convincente a capacidade de indução hormonal usando extrato de hipófise de lambari, porém o fato dos controles negativos, injetados com solução salina, também desovarem caracterizou o lambari como modelo biológico ruim para testes de desempenho reprodutivo, pois era sempre difícil discernir qual o efeito da indução hormonal. Por isso, partimos para o teste do extrato em outras espécies migradoras, principalmente em espécies em que se utilizam dosagem fracionada e que os controles negativos não desovam, no caso o curimatá e o tambaqui.

[032] Experimento 4: Obtenção de EBHL para reprodução do curimatá: No experimento 4, foi testado o EBHL na indução hormonal do curimatá, *Prochilodus*

lineatus, espécie que apresenta desova total e não desova sem indução hormonal em cativeiro. Para o experimento 4 foi necessário a obtenção de um novo extrato. Com base na similaridade dos resultados do EBHL OUT e DEZ, optamos por realizar um novo experimento para obtenção de extrato de hipófise apenas no mês de outubro para indução, reduzindo o tempo e manejo necessários. As mesmas condições aplicadas para obtenção do extrato ano de 2016 foram aplicadas. As fêmeas doadoras foram analisadas da mesma forma como descrito anteriormente e se mostraram novamente maduras e aptas para terem suas hipófises coletadas.

[033] Experimento 4: Delineamento experimental para o teste do EBHL dose fracionada em *Prochilodus lineatus*: Este experimento foi realizado para testar a eficácia de extrato na indução hormonal de *P. lineatus*, uma espécie de médio porte com desova total, e que não desova sem indução hormonal em cativeiro. Para isso, foram utilizadas 9 fêmeas e 18 machos adultos distribuídos aleatoriamente em caixas de água de 750 litros com 1 fêmea e 2 machos (proporção sexual macho: fêmea: 1:2) mantidos em sistema seminatural com recirculação fechada com temperatura controlada. Os peixes foram mantidos em caixas de 750L e em cada caixa apenas uma fêmea e dois machos. Um número maior de casais não foi utilizado por não ter sido encontrado um número maior de fêmeas aptas. Desta forma, optou-se por fazer uma análise descritiva dos dados. Os exemplares foram divididos nos seguintes grupos:

*Extrato bruto de hipófise de lambari coletado em outubro (EBHL - OUT) (n=2 fêmeas e 4 machos) (2 caixas)

*Extrato bruto de hipófise de carpa – controle positivo (CP) (n=3 fêmeas e 6 machos) (3 caixas)

*Solução salina de 0,9% de NaCl – controle negativo (C) (n=2 fêmeas e 4 machos) (2 caixas)

[034] Nos grupos OUT e CP, foram administradas a dosagem fracionada de 0,6 mg. Kg⁻¹ na primeira dose e 5,4 mg. Kg⁻¹ na segunda dose (10% + 90%) do respectivo extrato, exceto no grupo controle que recebeu volume igual de solução salina (~0,25mL.Kg⁻¹), com intervalo de 12 horas entre as doses, sendo a primeira dose aplicada as 12h30 e segunda dose as 00h30. O extrato foi diluído em solução salina e

aplicado por meio de injeção intramuscular. Nos machos de todos os grupos foi aplicado de 5,5 mg. Kg⁻¹ de CP no momento da segunda dose das fêmeas. A partir de 5 horas após a indução hormonal, as caixas foram monitoradas em intervalos de 30 minutos para observação de desova, quando desovada, foi aferido o volume de ovos e em seguida foram coletados em incubadoras. Os parâmetros avaliados foram apenas o desempenho reprodutivo.

[035] Experimento 4: Resultados obtidos: O EBHL foi eficaz na indução hormonal de *P. lineatus* com 100% de taxa de desova, apresentando boas taxas de fertilidade e eclosão. As fêmeas do grupo C não desovaram.

[036] Na Tabela 5 é possível observar a eficiência do EBHL em induzir a desova. Em alguns casos, as taxas de fertilidade foram zero, certamente pelo fato de os machos não terem espermiado no momento da ovulação. Fenômeno similar ocorreu no tratamento CP e é relativamente comum quando se usa o sistema semi-natural. Neste sistema precisa haver uma sincronia entre espermição e ovulação, já que os animais não foram extrusados. Destacamos que apesar deste problema mencionado, o CP e OUT induziram a ovulação em 100% das fêmeas injetadas e em todos os tratamentos mais de 5L de ovos foram obtidos por fêmea.

Tabela 5. Experimento 4. Desempenho reprodutivo de fêmeas de *P. lineatus* induzidas com dose fracionada de 6 mg.Kg⁻¹ de CP, OUT e C (0,9%NaCl). Abreviações: controle negativo (C), controle positivo (CP) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (OUT).

Grupos	Resposta à indução hormonal	Horas-grau	Volume de ovos por réplica (L)	Taxa de fertilidade (%)	Taxa de eclosão (%)
C	Não desovada	-	-	-	-
C	Não desovada	-	-	-	-

CP	Desovada	219,3	5,760	7	0
CP	Desovada	193,5	13,333	0	0
CP	Desovada	210,7	8,412	81,2	71,2
OUT	Desovada	227,9	13,225	80,6	51
OUT	Desovada	249,4	7,371	0	0

[037] Experimento 5: Obtenção de EBHL para reprodução do tambaqui: Diante dos resultados promissores com o curimatá, partiu-se para uma terceira etapa para testar o EBHL em outra espécie, agora de grande porte e a principal espécie nativa produzida pela aquicultura brasileira, o tambaqui, *Colossoma macropomum*. Assim como o curimatá, o tambaqui também é uma espécie de desova total e não desova sem indução hormonal em cativeiro. Assim como no teste para o curimatá, produzimos um novo extrato no mês de outubro para indução dos reprodutores. As mesmas condições aplicadas para obtenção do extrato ano de 2016 foram aplicadas. As fêmeas doadoras foram coletadas apenas em outubro e analisadas da mesma forma como descrito anteriormente.

[038] Experimento 5. Delineamento experimental para o teste do EBHL em *Colossoma macropomum*: Foram utilizadas 3 fêmeas e 6 machos adultos distribuídos aleatoriamente em caixas de água de 750 litros. Cada animal foi mantido individualmente em uma caixa de 750 L. Para o tambaqui foi utilizado o sistema de extrusão e fertilização a seco. Os exemplares foram divididos nos seguintes grupos:

*Extrato bruto de hipófise de lambari coletado em outubro (EBHL-OUT) (n=1 fêmea e 1 macho)

*Extrato bruto de hipófise de carpa – controle positivo (CP) (n=1 fêmea e 1 macho)

*Solução salina de 0,9% de NaCl – controle negativo (C) (n=1 fêmea e 1 macho)

[039] Nos grupos EBHL-OUT e CP foram administradas a dosagem fracionada de 0,6 mg. Kg⁻¹ na primeira dose e 5,4 mg. Kg⁻¹ na segunda dose (10% + 90%) do respectivo extrato. O grupo controle recebeu volume igual de solução salina, com intervalo de 12 horas entre as doses sendo a primeira dose aplicada as 11h30 e a segunda as 00h30.

O extrato foi diluído em solução salina e aplicado por meio de injeção intramuscular. Nos machos de todos os grupos foi aplicado de 5,5 mg. Kg⁻¹ de CP no momento da segunda dose das fêmeas. O volume de injetado foi de 0,25 mL.Kg⁻¹. A partir de 5 horas após a indução hormonal, as caixas foram monitoradas em intervalos de 30 minutos para observação de ovócitos ovulados no fundo das caixas. Neste momento os ovócitos foram coletados e fertilizados. O volume de ovos liberados por cada fêmea foi registrado bem como o período de latência e as taxas de fertilidade e eclosão (Tabela 5).

[040] Delineamento experimental para o teste do EBHL em *Colossoma macropomum* - resultados obtidos: O EBHL foi eficaz na indução hormonal de *C. macropomum* provocando ovulação na fêmea injetada (Tabela 6).

Tabela 6. Experimento 5. Teste de EBHL- OUT com dose fracionada em tambaqui. Desempenho reprodutivo de fêmeas de *C. macropomum* induzidas com dose fracionada de 6 mg.Kg⁻¹ de CP, EBHL-OUT e C (0,9%NaCl). Abreviações: controle negativo (C), controle positivo (CP) e extrato bruto de hipófise de lambari *A. altiparanae* coletado em outubro (EBHL-OUT).

Grupos	Resposta à indução hormonal	Horas-grau	Volume de ovos por réplica (mL)	Taxa de fertilidade (%)	Taxa de eclosão (%)
C	Não desovada		-	-	
CP	Desovada	301,3	169	79	36
OUT	Desovada	315,5	548	46,4	21,3

[041] Detalhamento para obtenção do EBHL: Experimento 1: Uso de EBHL para indução da própria espécie: Desenvolveu-se um manejo específico (densidades de estocagem, tempo de manutenção, idade dos animais e outras características que serão descritas) para obter o EBHL com capacidade para induzir a desova de peixes migradores em cativeiro. Para isso, 10 viveiros escavados de 81m³ (9m x 6m x 1,5m), telados com telas antipássaros, foram povoados com 2500 exemplares adultos (fêmeas

e machos) de lambari *A. altiparanae* ($8,2 \pm 0,9$ cm; $15,1 \pm 6,6$ g, comprimento e massa, respectivamente). Os exemplares foram distribuídos aleatoriamente e igualmente ($n=250$ espécimes por viveiro) de modo que a densidade foi de $3,08$ peixes/ m^3 (466 gramas de peixes/ m^3). Não houve sexagem antes do povoamento. Os viveiros foram abastecidos com uma vazão constante de água ($\cong 30L \cdot min^{-1}$), análises físico-químicas da água foram realizadas semanalmente e os peixes foram arraçoados com ração comercial extrusada para peixes onívoros Nutripiscis® $2,6$ mm (36% de proteína bruta) duas vezes ao dia até aparente saciedade. Os animais foram distribuídos nos viveiros em 05 de outubro de 2016 e permaneceram 19 dias em processo de aclimação.

[042] Processo de coleta: Para a coleta das hipófises, apenas fêmeas foram utilizadas, as quais foram selecionadas com base nas características externas como ventre abaulado e irrigação sanguínea. Após serem eutanasiadas com solução de benzocaína ($0,1g \cdot L^{-1}$), tiveram as hipófises e fragmentos de ovários coletados. Imediatamente após a anestesia, a cabeça do animal foi cortada para facilitar a extração das hipófises, em seguida foi realizado um corte horizontal para retirada do tampão da cabeça para visualização do encéfalo, avistado o encéfalo este foi rebatido para ter acesso a hipófise, por esta glândula estar inserida numa cavidade denominada cela túrcica foi necessário fazer mais um corte, agora no sentido horizontal expondo esta cavidade e assim retirando a hipófise. O procedimento de extração foi o mesmo aplicado por Woynarovich e Horváth (1983).

[043] A Figura 1 apresenta o procedimento para coleta de hipófises de *A. altiparanae*. a) Corte da cabeça; b-c) Corte horizontal para retirada do tampão da cabeça; d) Acesso ao encéfalo; e) Arrebatamento do encéfalo para ter acesso a hipófise; f) Localização da hipófise; g) Retirada da hipófise com auxílio de uma pinça; h) Preservação da hipófise em acetona pura; i) Secagem das hipófises em vidro de âmbar em dessecador de sílica em gel para armazenamento.

[044] Processo de armazenamento: Imediatamente após a retirada das hipófises, elas foram colocadas em um vidro âmbar com acetona para retirada de gordura e preservação, a acetona foi descartada. Decorridos de 8 a 12 horas a acetona foi trocada. Após este material ter permanecido por 24 horas nesta solução, a acetona foi

descartada e as hipófises colocadas em dessecador com sílica gel. Após decorridos 24 horas, as hipófises já estavam secas e prontas para serem armazenadas em local fresco com a devida identificação para posteriormente serem utilizadas no processo de indução hormonal. Seguindo metodologia proposta por Woynarovich e Horváth (1983).

[045] O extrato utilizado rotineiramente é importado e de alto custo. Uma vez que demonstramos eficiência similar entendemos que nosso produto é mais atrativo por possuir custo menor e ser um produto nacional. Quando produzido pelo próprio produtor de peixe, o extrato poderia ser produzido de acordo com a necessidade de produtor evitando desperdícios e perda de validade. O excedente poderia ser comercializado a outros produtores e a cooperativas agregando valor na produção. Hoje quase 100% da produção de peixes nativos do Brasil que precisam ser induzidos em cativeiro, a desova é feita com extrato de hipófise de carpa, inclusive a do tambaqui. A proposta de um novo produto, se economicamente viável (ainda a ser testado) poderia atrair uma parte deste mercado e criar um nicho específico de empresas e profissionais para este segmento de produtos bioativos nacionais, incluindo start ups e empresas em desenvolvimento em universidades.

[046] Em relação à viabilidade de comercialização, segundo dados do IBGE (2018), o Brasil possui um grande número de propriedades produtoras de espécies de peixes, embora o maior número de estabelecimentos seja representado por tilápias e carpas, as espécies nativas tem grande representatividade, distribuídas em todas as regiões do país, mostrando que aquicultura dos nativos é uma “grande mola” propulsora da economia no Brasil. Tanto as carpas como os peixes migradores nativos são induzidos à desova por meio de hipofisação. Desta forma, com um grande número de estabelecimentos na criação de espécies que são reproduzidos artificialmente em cativeiro (hipofisação), estas propriedades seriam potenciais compradoras do extrato de hipófise de lambari, ou até mesmo as próprias produtoras. Destacamos ainda, que o número de estabelecimentos de lambari, ocupa a quinta colocação, estando apenas atrás dos nativos, tambaqui e jundiá sendo oficialmente registrados 23.028 estabelecimentos produtores de lambari em todo o Brasil. Não existem dados sobre a demanda de uso de extrato de hipófise de peixes no Brasil, mas sem contabilizar o uso

para pesquisa privada e pública e uso para peixamento, de acordo com dados do IBGE no Brasil, e excluindo os estabelecimentos que produzem tilápias (não são hormonalmente induzidas à desova, estão catalogados 341283 estabelecimentos que produzem peixes que precisam ser hormonalmente induzidos a desova em cativeiro IBGE (2018)). Portanto é um potencial aparentemente elevado de consumidores do produto proposto.

REIVINDICAÇÕES

1. OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE HIPÓFISE DE *ASTYANAX ALTIPARANAE* PARA USO NA REPRODUÇÃO INDUZIDA DE PEIXES, a dita obtenção do extrato, compreende o desenvolvimento de um manejo específico (densidades de estocagem, tempo de manutenção, idade dos animais e outras características que serão descritas) para obter o EBHL com capacidade para induzir a desova de peixes migradores em cativeiro, **caracterizado por** compreender o seguinte procedimento: 10 viveiros escavados de 81m^3 (9m x 6m x 1,5m), telados com telas antipássaros, são povoados com 2500 exemplares adultos (fêmeas e machos) de lambari *A. altiparanae* ($8,2 \pm 0,9$ cm; $15,1 \pm 6,6$ g, comprimento e massa, respectivamente); os exemplares são distribuídos aleatoriamente e igualmente ($n= 250$ espécimes por viveiro) de modo que a densidade foi de $3,08$ peixes/ m^3 (466 gramas de peixes/ m^3); não há sexagem antes do povoamento; em que os viveiros são abastecidos com uma vazão constante de água ($\cong 30\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$); em que as análises físico-químicas da água são realizadas semanalmente e os peixes são arraçoados com ração comercial extrusada para peixes onívoros Nutripiscis® 2,6 mm (36% de proteína bruta) duas vezes ao dia até aparente saciedade; os animais são distribuídos nos viveiros e permanecem 19 dias em processo de aclimação.

2. OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE HIPÓFISE DE *ASTYANAX ALTIPARANAE* PARA USO NA REPRODUÇÃO INDUZIDA DE PEIXES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender a coleta das hipófises, em que apenas fêmeas são utilizadas, as quais são selecionadas com base nas características externas como ventre abaulado e irrigação sanguínea; em que após serem eutanasiadas com solução de benzocaína ($0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), elas têm as hipófises e fragmentos de ovários coletados; em que imediatamente após a anestesia, a cabeça do animal é cortada para facilitar a extração das hipófises, em seguida foi realizado um corte horizontal para retirada do tampão da cabeça para visualização do encéfalo, avistado o encéfalo este foi rebatido para ter acesso a hipófise, por esta glândula estar inserida numa cavidade denominada cela túrcica foi necessário fazer mais um corte, agora no sentido horizontal expondo esta cavidade e assim retirando a hipófise.

3. OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE HIPÓFISE DE *ASTYANAX ALTIPARANA*E PARA USO NA REPRODUÇÃO INDUZIDA DE PEIXES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar o armazenamento imediatamente após a retirada das hipófises, as quais são colocadas em um vidro âmbar com acetona para retirada de gordura e preservação, e posterior descarte da acetona; em que decorridos de 8 a 12 horas a acetona é trocada; em que após este material ter permanecido por 24 horas nesta solução, a acetona é novamente descartada e as hipófises colocadas em dessecador com sílica gel; em que após decorridos 24 horas, as hipófises já secas e prontas para serem armazenadas em local fresco com a devida identificação para posteriormente serem utilizadas no processo de indução hormonal.

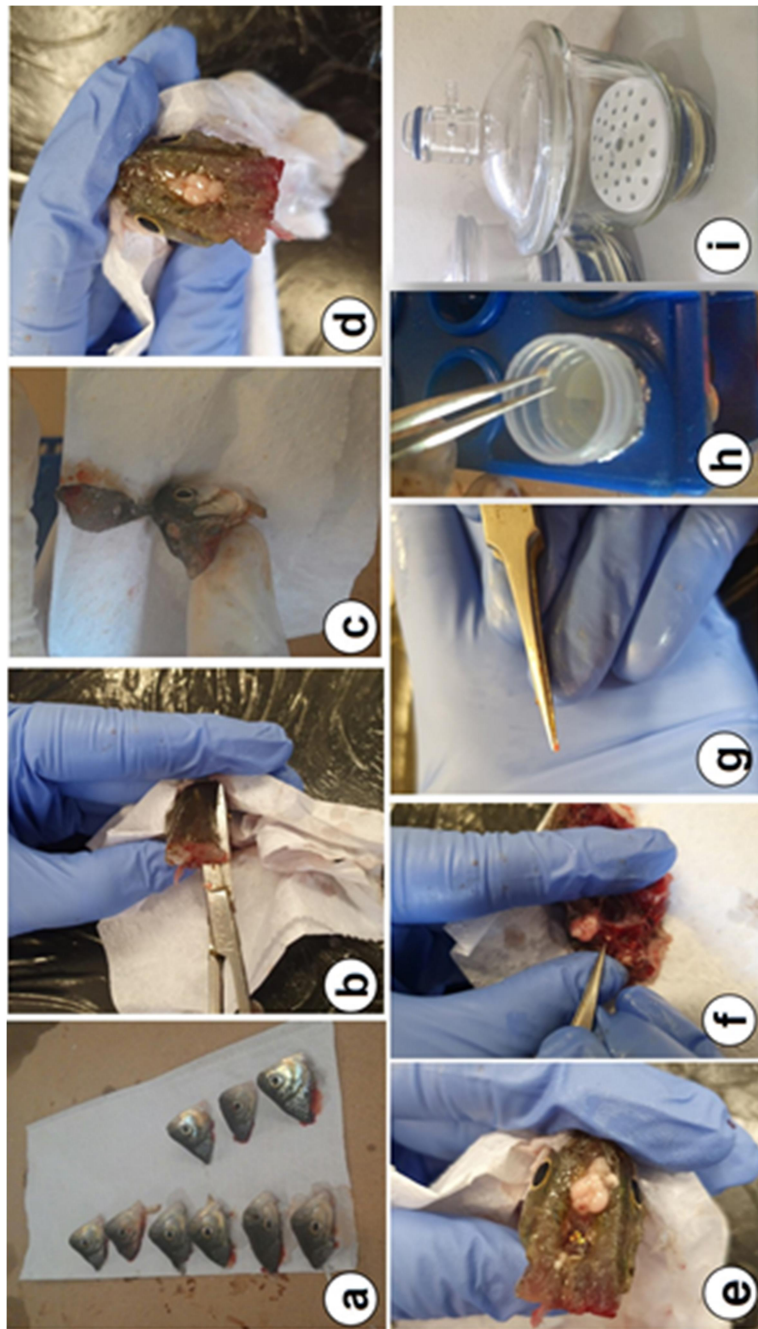


FIGURA 1

RESUMO

OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE HIPÓFISE DE *ASTYANAX ALTIPARANAE* PARA USO NA REPRODUÇÃO INDUZIDA DE PEIXES

O presente pedido de patente de invenção descreve o primeiro protocolo de obtenção de extrato bruto de glândula pituitária de lambari, *Astyanax altiparanae*, (EBHL) eficaz para induzir a reprodução de peixes em cativeiro. Definimos aqui as condições específicas e inéditas para a manutenção dos lambaris em viveiros escavados com o objetivo de obter um extrato eficaz, são elas: época do ano em que os peixes devem ser estocados; o período de armazenamento dos peixes; as dimensões dos viveiros escavados; e a densidade populacional e fluxo de água. Para isso, 10 viveiros escavados (81m³: 9m x 6m x 1,5m) foram usados e inicialmente 2500 espécimes de lambari adultos (fêmeas e machos) foram distribuídos igual e aleatoriamente (n = 250 espécimes por tanques de terra), de modo que a densidade foi de 3,08 peixes / m³. Para avaliar a eficácia do EBHL obtido em dois períodos após o povoamento dos viveiros, testamos inicialmente seu uso na reprodução induzida do próprio lambari. O EBHL promoveu a desova na própria espécie, entretanto, concluímos que o lambari não é um bom modelo experimental para testes de indução hormonal, uma vez que animais não injetados (controle negativo) podem desovar, mesmo em menor intensidade do que animais induzidos hormonalmente, trazendo ruído às análises e conclusões.