

Departamento de Química Orgânica e Biológica
Diretor: Prof. Dr. Fonseca Ribeiro

SÔBRE A TÉCNICA DE HIPOFISAÇÃO DE PEIXES (*) (ON THE TECHNIC OF FISHES' HYPOPHYSATION)

J. F. Tabarelli Neto
Livre Docente

O. F. Ribeiro
Tecnologista

Maiores serão as vantagens auferidas pelo piscicultor, quanto mais facilmente possa êle controlar, de um modo direto o fenômeno da reprodução. Essa facilidade é apresentada, "in natura", nas regiões temperadas onde os peixes crescem lentamente e a fase da procriação se estende por espaço de tempo superior a 1, ou mesmo 2 meses. Durante todo êsse tempo podem os reprodutores ser apanhados, convenientemente selecionados e a seguir submetidos ao processo da fecundação artificial, método êste que permite uma porcentagem de aproveitamento notavelmente elevado, de vez que é possível uma proteção imediata com aproveitamento quasi total dos ovos, sendo afastadas tôdas as causas de destruição próprias do ambiente natural.

Assim se apresenta o fenômeno aos piscicultores europeus ou norte-americanos, o mesmo acontecendo com o peixe-rei para o piscicultor argentino.

Contudo, e aqui transcrevemos as próprias palavras de VON IHERING, (3) — idealizador e introdutor do método de hipofisação de peixes, — "a maturação das gônadas está sujeita à leis muito diversas, nas espécies típicas da nossa fauna. Lentamente os ovários se avolumam e durante semanas ou mesmo meses se conservam túrgidos, sem contudo se prestarem à fecundação artificial.

Ao comprimir fortemente o ventre, consegue-se a extrusão de óvulos, que porém, formam uma massa compacta, com todos os característicos de óvulos imaturos.

E neste estado se conservam os óvulos durante 2 ou 3 meses, até o momento em que repentinamente, devido à influências ignotas, se dá o amadurecimento. Tal transformação, coincide com as chuvas, as enchentes do rio, talvez com trovoadas ou modificações de fatores físicos da água. Então os óvulos se tornam translúcidos e fluem facilmente à menor pressão, bastando mesmo as contorsões do peixe que se debate, para que a massa de óvulos, à semelhança de sagú cozido, escorra às golfadas.

Ê êsse o momento propício para a fecundação".

(*) Trabalho apresentado ao III Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, realizado em Porto Alegre, em Outubro de 1945.

No entretanto, sendo os peixes muito sensíveis a êste momento ótimo e fugás do ambiente, aproveitam-no para a desova, fenômeno que se desenvolve com rapidêz tal, que horas depois o ovário expeliu todos os óvulos maduros. Êste comportamento faz com que o referido ato passe, muitas vezes, despercebido ao piscicultor, perdendo assim aquêles poucos momentos favoráveis à extrusão dos óvulos, e encontrando logo após unicamente ovários sanguinolentos e vazios, apenas com os óvulos imaturos remanescentes. Analisando os fatores que determinam a reprodução dos peixes na natureza, PEDRO DE AZEVEDO e BORGES VIEIRA (11), qualificaram-n'a como "um episódio imprevisível, de curta duração e sujeito a tôda sorte de incertezas".

Eis aí, o primeiro obstáculo apresentado a VON IHERING, quando, dedicando-se a estudos relativos ao campo da ictiologia, procurou submeter à fecundação artificial, os nossos peixes de água doce. Na impossibilidade de aplicar ao nosso meio, aquêles conhecimentos adquiridos pelo piscicultor das zonas temperadas, fez-se necessário a introdução de um processo que possibilitasse um contrôlo direto do ato da reprodução, visando de um lado, conseguir a desova espontânea dos peixes de "piracema" em ambientes de águas paradas e, por outro lado, permitir um índice elevado de aproveitamento da criação, fato que não ocorre quando esta última é sujeita aos recursos naturais de multiplicação.

Tendo por base os estudos endocrinológicos, que mostraram a importante função do lóbo anterior da hipófise na esfera sexual, principalmente aquêle de HOUSSAY (21); VON IHERING e colaboradores, (1 a 7), procuraram através da introdução artificial, no organismo dos reprodutores, de uma determinada dose do hormônio gonadotrópico, acelerar o fenômeno da gametogênese nos peixes. Processo êsse, único aconselhável, dada a impossibilidade de se poder determinar, qual o *fator imediato* ou estímulo final (ainda hoje pouco definido), cujo efeito, "in natura", se fazia notar na intimidade do organismo dos reprodutores, determinando a descarga do hormônio gonadotrópico hipofisário, que os induzia a procura mútua dos sexos e a realização da desova.

Terminada a primeira fase de experiência, verificou-se a possibilidade da aplicação do método referido, uma vez que se utilizasse como agente gônado estimulante a hipófise obtida de outros peixes, pois que entre êstes sêres, dado o grande número de provas negativas quando da introdução do hormônio gonadotrópico das mais variadas origens, parecia existir com respeito aos hormônios determinantes da relação gênito hipofisária, uma verdadeira especificidade.

Comprovou-se além disso a eficiência do método, pelas modificações induzidas na estrutura dos órgãos genitais, (8).

Daí por diante, outros pesquisadores, (8 a 14), continuaram a obra iniciada por VON IHERING, e com relação a evolução sofrida pelo processo original, passamos a descrever o sumário, que a respeito da mesma, um de nós teve a oportunidade de publicar (22) :

“Quanto à técnica seguida na hipofisação dos nossos peixes podemos estabelecer 2 fases: na primeira, eram as hipófises, ainda frescas trituradas em sôro fisiológico, e, essa suspensão integral da glândula injetada no peixe. Muitos eram, porém, os inconvenientes decorrentes de tal processo: era necessário escolher os doadores no ato da hipofisação, sacrificá-los, craniotomizá-los e proceder-se a extração das glândulas, além de que os detalhes relativos à assepsia, eram sempre precários. Ainda nessa fase tentou-se o emprêgo de hipófises secas as quais, contudo, não agiam com a mesma eficácia 6 meses após a dessecação, (4 e 10).

Numa segunda fase, PEDRO DE AZEVEDO e ESTEVÃO DE OLIVEIRA (20), deram um grande passo na técnica de hipofisação, ao verificarem a possibilidade de conservação da hipófise em álcool absoluto, veículo que não solubiliza o princípio gônado estimulante da glândula, nem lhe altera a potencialidade, mesmo após um ano.

De grande valor foi êsse achado, pois corrigiu em grande parte os inconvenientes do primeiro processo: permitiu que uma assepsia melhor fôsse observada durante a hipofisação, consentiu usar com sucesso a técnica de “aplicação de pequenas doses repetidas (doses mínimas iniciais, com aumento progressivo), dentro de um prazo inferior ao da ação hormonal, a-fim-de evitar solução de continuidade no estímulo inicial”. Além disso, “a conservação da hipófise em álcool absoluto veio abrir vasto campo para o estudo do hormônio gônado estimulante, não só no que diz respeito ao seu isolamento como também no que concerne ao emprêgo da hipófise de doadores nas diferentes fases da evolução sexual”.

Atualmente, de modo resumido, o processo consiste no seguinte: não existindo ainda uma unidade fisiológica, a própria glândula é usada como tal. Tirada as hipófises do líquido conservador, são estas enxutas em papel de filtro e trituradas em água destilada; centrifuga-se e injeta-se o líquido sobrenadante pela via intramuscular, em volume nunca superior a 0.5 cm³. As doses variam não só segundo a espécie, como também com o estado de maturação das gônadas dos receptores, obtendo-se melhores resultados quando se inoculam quantidades gradativamente crescentes e intervaladas por

espaço de tempo que vai de 5 a 6 horas. Geralmente a dose inicial varia de 1/8 a 1/4 de hipófise, e o número total de glândulas injetadas até a obtenção da desova está, como é claro, na dependência das condições prévias do animal, comumente entre 2,5 a 5 hipófises.

Deve ser meticulosa a observação do técnico não só na escolha dos reprodutores a serem injetados como também durante o período de hipofisação, de modo que as doses sejam reguladas de tal maneira a evitar uma discronia de maturação do macho para a fêmea, pois, a possibilidade de uma boa fecundação, está em se fazer com que o macho e a fêmea cheguem, simultaneamente, à maturação dos seus órgãos gonadais".

Aperfeiçoada a técnica de hipofisação, pela modificação introduzida no processo original, segundo os estudos de PEDRO DE AZEVEDO e ESTEVÃO DE OLIVEIRA, acima referidos, constitui hoje em dia trabalho de rotina dos Postos de Piscicultura.

Não obstante o aperfeiçoamento alcançado e os ótimos resultados que eram obtidos, principalmente no Nordeste do país, importava sobretudo simplificar o método para que ele se tornasse de mais fácil e ampla aplicação.

Em 1943, por sugestão do Dr. ALCIBIADES MARQUES, diretor da *Estação Experimental de Caça e Pesca*, propuzemos-nos fazer algumas pesquisas sobre a questão. Demos início aos nossos trabalhos, preparando um extrato glicerinado de hipófise de peixes, cuja técnica de obtenção e eficácia, foi por um de nós publicada (22), tendo também R. S. MENEZES (24) naquela ocasião, chegado a resultados positivos ao se utilizar do nosso método.

Embora pese o pequeno número de experiências levadas à efeito, por motivos contrários a nossa vontade, não deixam de ser animadoras as novas observações feitas com a aplicação do extrato glicerinado.

No presente trabalho faremos referências não somente às modificações introduzidas na técnica da preparação do extrato glicerinado e sua eficácia, mas principalmente, na capacidade de conservação do seu potencial de atividade, fato êste de importância capital, no que diz respeito ao método de hipofisação, como veremos mais adiante.

Passamos a descrever a técnica atual de preparação do extrato glicerinado, cuja modificação nos pareceu aconselhável.

1.^o — As hipófises retiradas do líquido conservador são enxutas em papel de filtro, pesadas e trituradas em gal. 2.^o — Junta-se água destilada. 3.^o — Leva-se à geladeira pelo espaço de 48 horas.

4.^o — Adiciona-se glicerina, em volume duplo ao da água destilada. 5.^o — Leva-se novamente à geladeira pelo espaço de 48 horas. 6.^o — Centrifuga-se. 7.^o — Despreza-se o sedimento e distribue-se o líquido sobrenadante, em pequenos vidros com rôlhas de borracha. O volume líquido, como é natural, depende da concentração que se deseja dar ao extrato. Geralmente adotamos um volume total de líquido que permite 10 hipófises por centímetro cúbico.

Embora não se tenha ainda chegado a uma conclusão definitiva sobre o teor hormonal das hipófises de peixes, quer em relação à idade, quer ao estado de desenvolvimento dos órgãos sexuais, é de se recomendar ao menos por enquanto, que se utilizem hipófises de peixes com as gônadas em grau de maturação adiantada (27).

Inicialmente aconselhávamos a conservação do extrato na geladeira, como uma garantia da conservação por um período de tempo mais longo; pudemos verificar, entretanto, a perfeita eficácia do mesmo, um ano após a sua preparação; (ver ficha de hipofisação n.^o 1). Embora o extrato conservado no frio mantenha sua potencialidade por um espaço de tempo que ainda não pudemos estabelecer em seu limite extremo, verificamos também que o mesmo, mantido a temperatura do ambiente, conservou a sua ação mesmo após um ano e meio; (ver ficha de hipofisação n.^o 2).

É justamente nesta sua capacidade de conservação que se prende uma das mais importantes características da introdução do extrato glicerinado na técnica de hipofisação, de vez que até bem pouco não se havia conseguido método capaz de conservar sua atividade por um prazo de tempo suficiente para permitir a hipofisação de todos os reprodutores de cada lote na frequência desejada; assim com a finalidade de se reduzir as causas de erros decorrentes do emprego de glândulas de teor hormonal variável, aconselhava-se fazer alguns minutos antes de cada tratamento, um extrato em sôro fisiológico, pela utilização de um número de hipófises muitas vezes maior do que bastaria para a quantidade de peixes a serem injetados; claro que por essa forma, diminuindo as causas de erro pelas variações da riqueza hormonal dos órgãos, tinha-se, por outro lado, uma grande perda de material.

O extrato glicerinado, solução hormonal, capaz de manter a sua potencialidade, segundo observação até agora feita, pelo tempo mais acima referido, veio corrigir esta parte, aliás importantíssima da técnica de hipofisação. Não somente, isso, como também, tornar o processo muito mais prático, — (dispensa o preparo prévio da solução hormonal antes de cada injeção) —, mais uniforme e eficiente,

garantindo ainda uma assepsia melhor. Assim, R. S. MENEZES e colaboradores (25), empregando o extrato glicerinado em hipofisacões levadas a efeito no Nordeste do país, conseguem ótimos resultados, aplicando as injeções na freqüência de 8 em 8 horas, e não mais de 5 a 6 horas como no processo anterior. "Isto permite um repouso maior à turma de hipofisacão a qual pode trabalhar normalmente, no expediente comum, sem qualquer fadiga. Observa-se maior uniformidade nos resultados, como consequência direta do emprêgo de 100 hipófises em cada ampôla de 10 cm³". FONTENELE, e colaboradores (26), conseguiram por meio do extrato glicerinado, quatro desovas nos mesmos reprodutores de Curimatã, *Prochilodus sp.*, no espaço de 11 meses, quando mantidos em viveiros de pequenas dimensões.

Um ponto de grande importância que precisa ainda ser resolvido é o da padronização do extrato glicerinado; é evidente que o extrato, podendo ser preparado de cada vez com número muito grande de hipófises, oferece mais probabilidades de fornecer sempre concentrações de potência hormonal semelhantes; porém, um tipo de dosagem, fôsse química ou biológica, importaria um grande progresso. Nas tentativas que já realizamos a respeito, utilizando o sapo, *Bufo marinus* (L.), (23), não conseguimos resultados satisfatórios, verificando que êsse batráquio responde à injeção de hipófise total de peixe mas é insensível à aplicação do extrato.

Consignamos aqui os nossos agradecimentos a todos aquêles que nos prestaram o seu auxílio desinteressado, notadamente aos Drs. Cirilo Mafra Machado e José Vaz e ao Snr. Ismael Fonseca Ribeiro.

FICHA DE HIPOFISACÃO N.º 1

Data: 30/9/944

Lote A

EXTRATO GLICERINADO PREPARADO EM 5/10/943 E CONSERVADO NA GELADEIRA

Concentração: 10 hipófises por cm³.

Número de peixes: — 3.

Machos — 2; fêmeas — 1.

Espécie: *Cyprinus carpio*.

Dose	Dia	Hora	1 ♂	1 ♀	Veículo
1. ^a	30	7	1 H	1/2 H	0,5 cm ³
2. ^a	30	13	1,5 H	1 H	0,5 cm ³
3. ^a	30	19	2 H	1,5 H	0,5 cm ³

Resultado: Desova pela madrugada do dia 1/10. Eclosão após 82 horas de incubação. Embriogênese normal com bom aproveitamento.

FICHA DE HIPOFISAÇÃO N.º 2

Data: 28/8/945

Lote C

EXTRATO GLICERINADO PREPARADO EM 8/3/944 E
CONSERVADO À TEMPERATURA AMBIENTE

Concentração: 10 hipófises.

Número de peixes: — 3.

Machos — 2; fêmeas — 1.

Espécie: *Cyprinus carpio*, var. *specularis*. (Carpa espelho).

Dose	Dia	Hora	1 ♂	1 ♀	Veículo
1. ^a	28	10	½ H	½ H	0,5 cm ³
2. ^a	28	16	1 H	1 H	0,5 cm ³
3. ^a	28	22	2 H	2 H	0,5 cm ³

Resultado: Desova pela madrugada do dia 29. Eclosão após 72 horas de incubação. Embriogênese normal. Larvas em quantidade apreciável.

SUMÁRIO

A técnica de hipofisação de nossos peixes, foi idealizada e posta em prática por VON IHERING, dadas as condições especiais que, em nosso meio, cercam o ato reprodutivo daqueles animais, principalmente com relação aos peixes de águas correntes, ou segundo a terminologia limnológica, de *ambientes lóticos*.

Ofereceu o referido método, tôdas aquelas vantagens previstas pelo cientista acima referido, sendo a sua técnica adotada por diversos pesquisadores estrangeiros, (15 a 19). Dentre as principais vantagens podemos citar as seguintes:

- a) possibilidade da prática da fecundação artificial.
- b) índice elevado de aproveitamento, — vantagem esta que permite a aplicação do processo aos peixes de águas paradas ou de *ambientes lénticos*, uma vez que a desova processada “in natura”, oferece escasso aproveitamento.
- c) permitir as tentativas de cruzamento das espécies de peixes morfológicamente afins, porém fisiológicamente isolados por desovarem em épocas diferentes.
- d) permitir estabelecer a hora provável da desova.

A técnica original, vem, através de novas pesquisas, sofrendo modificações de modo a se tornar mais prática e eficiente.

Iniciando a nossa colaboração nesses estudos, preparamos um extrato glicerinado de hipófises de peixes, que pelo seu comportamento, segundo observações efetuadas, veio tornar a referida técnica de

mais fácil e ampla aplicação. Isto porque, o extrato glicerinado oferece:

a) uma solução hormonal capaz de conservar a sua atividade, quando mantida quer no frio, quer na temperatura ambiente, por espaço mínimo de um ano e meio, pois ainda não pudemos estabelecer o limite extremo da referida conservação.

b) a mesma solução hormonal permite a hipofisação de todos os reprodutores de cada lote, na frequência desejada, o que vem facultar uma avaliação mais ou menos precisa das doses a administrar, tornando os resultados mais uniformes.

c) torna a técnica mais prática uma vez que dispensa o preparo prévio da solução hormonal antes de cada injeção; permitindo que as injeções sejam aplicadas numa frequência mais espaçada, o que torna mais suave o trabalho do técnico.

d) garante uma assepsia melhor.

SUMMARY

This paper includes two parts: mainly the A.A. review not only a summary of the modifications that have occurred in the technic of the hypophysation of fishes in Brazil, from the early works of von IHERING as they also appoint all the advantages brought to the Brazilian pisciculture by the utilization of the method above referred; secondly the A.A. appoint the recent modifications in the original process by the use of a glycerinate extract from fish hypophysis (FONSECA RIBEIRO and TABARELLI NETO). To such innovation they have collaborated according to papers previously published, in which they demonstrated its efficacy. They founded experimentally new behaviors of glycerinate extract, especially referring to the capacity of the conservation of its hormonal activity even when kept in the icebox or in the room temperature. They describe the advantages offered by the modifications mentioned as well as some results obtained by other workers who have used the glycerinate extract.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — IHERING, R. VON — AZEVEDO, P. DE — 1934 — A curimatã dos açudes nordestinos ("Prochilodus argenteus"). *Arch. Inst. Biol., S. Paulo*, 5: 143-83
- 2 — IHERING, R. VON — 1935 — Die Wirkung von Hypophyseninjektion auf den Laichakt von Fischen. *Zool. Anz.*, 3: 273-9
- 3 — IHERING, R. VON — 1935 — O papel da hipófise na piscicultura nacional. *O Campo*, Rio de Janeiro, 6 (11): 22-3

- 4 — IHERING, R. VON — AZEVEDO, P. DE — 1936 — As piábas dos açudes nordestinos (Characidae, Tetragonopterinae). *Arch. Inst. Biol.*, S. Paulo, 7: 75-106
- 5 — IHERING, R. VON — AZEVEDO, P. DE — 1936 — A desova e a hypophysação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. *Arch. Inst. Biol.*, S. Paulo, 7: 107-18
- 6 — IHERING, R. VON — 1937 — Bewegung des Ei-inhaltes zweier brasilianischer Süßwasserfische. *Zool. Anz.*, 120: 45-51
- 7 — IHERING, R. VON — AZEVEDO, P. DE — 1937 — Über die Wirkung des Säugetier-Hypophysenhormons auf den Laichakt der Fische. *Zoll. Anz.*, 120: (3-4): 71-5
- 8 — CARDOSO, D. M. — 1934 — Relação genito-hipofisária e reprodução nos peixes. *Arch. Inst. Biol.*, S. Paulo, 5: 133-6
- 9 — PEREIRA, JR., J. — CARDOSO, D. M. — 1934 — Hypophyse et evulation chez les poissons. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 116 (11): 1133-4
- 10 — AZEVEDO, P. DE — CANALE, L. — 1938 — A hipófise e sua ação nas gônadas dos peixes neotrópicos. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 9: 165-86
- 11 — AZEVEDO, P. DE — VIEIRA, B. B. — 1940 — Realizações da Comissão Técnica de Piscicultura do Nordeste. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 11: 23-38
- 12 — MARQUES, A. — 1941 — A hipófise em piscicultura. *Bol. Ind. Animal N. S.*, 4: 114-23
- 13 — MENEZES, R. SIMÕES DE — 1943 — O método de hipofisação de peixes na piscicultura. *O Campo*, Rio de Janeiro, 14 (160): 39-44
- 14 — VIEIRA, B. B. — MARQUES, A. — 1942 — A desova da carpa provocada pela ação da hipófise de peixe. *Bol. Ind. Animal N. S.*, 5 (4): 164-71
- 15 — GERBILSKY, N. L. — 1938 — L'influence de l'agent gonadotrophe de l'hypophyse sur l'état de la fraieson chez P"Acipenser stellatus". *C. R. (Doklady). Acad. Sci. U. R. S. S.*, 19 (4): 333-6
- 16 — GERBILSKY, N. L. — 1938 — Effect des injections crâniennes de suspension d'hypophyse chez les téléostéens. *C. R. (Doklady), Acad. Sci. U. R. S. S.*, 19 (4): 327-31
- 17 — HASLER, ARTHUR D. — MEYER, ROLAND K. — FIELD, HOWARD W. — 1940 — The use of hormones for the conservation of muskellage *Copeia 1940*, (1): 43-6, "in" *Biol. Abst.* 14: 15756
- 18 — KNOWLES, F. G. — 1939 — The influence of anterior-pituitary and testicular hormones on the sexual maturation of lampreys. *J. Exp. Biol.* 16 (4): 535-47
- 19 — KOCH, W. — SCHERING, L. — 1936 — Die Wirkung von Hypophysenvordelappen Hormon auf den Laichakt von Fischen. *Zool. Anz.*, 118: 62-64
- 20 — AZEVEDO, P. DE — OLIVEIRA, A. C. ESTEVÃO DE — 1939 — Sobre o emprêgo da hipófise conservada em alcool na desova dos peixes. "in" Livro de homenagem aos profs. Alvaro e Miguel Osorio de Almeida, 35-42
- 21 — HOUSSAY, B. A. — 1930 — Acción sexual de la hipófises en los peces y reptiles. *Rev. Soc. Arg. Biol.*, 6: 686-88
- 22 — FONSECA RIBEIRO — TABARELLI NETO, J. F. — 1944 — Da obtenção de um extrato glicerinado para a hipofisação de peixes. *Rev. Fac. Med. Vet.*, S. Paulo, 2 (4) 227-32.

- 23 — FONSECA RIBEIRO — TABARELLI NETO, J. F. — 1943 — Ação da hipófise de peixe sobre o oviduto do sapo, *Bufo marinus* (L). *Rev. Fac. Med. Vet.*, S. Paulo, 2 (3): 99-102
- 24 — MENEZES, R. SIMÕES DE — 1944 — Nota sobre a hipofisação de peixes do rio Mogi-Guaçu com extrato glicerinado de hipófises de peixe. *Bol. Ind. Animal N. S.*, 7 (3-4): 36-44
- 25 — MENEZES, R. SIMÕES DE — FONTENELLE, O — CAMACHO, E. C. — 1945 — Sobre o uso do extrato glicerinado de hipófises de peixes na reprodução dos peixes dos açudes do Nordeste do Brasil. *Rev. Fac. Med. Vet.*, S. Paulo, 3 (1-2): 175-82
- 26 — FONTENELLE, O. — CAMACHO, E. C. — MENEZES, R. SIMÕES DE — 1946 — Obtenção de três desovas anuais de Curimatã, *Prochilodus* sp., (PISCES: characidae, prochilodinae), pelo método de hipofisação. (Nota prévia). *Bol. Mus. Nacional, Zool.*, N. S. (53): 1-9.
- 27 — MENEZES, R. SIMÕES DE — 1945 — Ação de hipófises de peixes doadores em diestro sobre peixes reprodutores em estro. *Rev. Brasil. Biol.*, 5 (4): 535-9