

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Perfil hormonal durante o ciclo reprodutivo e
reprodução induzida da garoupa verdadeira
(*Epinephelus marginatus*) (Teleostei:
Serranidae) em cativeiro**

Jandyr de Almeida Rodrigues Filho

Jaboticabal, SP
2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Perfil hormonal durante o ciclo reprodutivo
e reprodução induzida da garoupa
verdadeira (*Epinephelus marginatus*)
(Teleostei: Serranidae) em cativeiro**

Jandyr de Almeida Rodrigues Filho

Orientador: Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton

Tese apresentada ao
Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura
da UNESP – CAUNESP,
como parte dos requisitos
para obtenção do título de
Doutor.

Jaboticabal, SP
2016

R696p Rodrigues-Filho, Jandy de Almeida
Perfil hormonal durante o ciclo reprodutivo e reprodução induzida da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*) (Teleostei: Serranidae) em cativeiro / Jandy de Almeida Rodrigues Filho. – – Jaboticabal, 2016
ii, 56 p. ; 29 cm

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2016

Orientador: Renata Guimarães Moreira Whitton

Banca examinadora: Sergio Ricardo Batlouni, Laura Satiko Okada Nakaghi, Maria Inês Borella, Renato Massaaki Honji

Bibliografia

1. Esteroides gonadais. 2. Gonadotropinas. 3. Ciclo anual. 4. Reprodução induzida. 5. Diâmetro ovocitário. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.034

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

SUMÁRIO

EPÍGRAFE.....	i
DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	01
APOIO FINANCEIRO.....	04
RESUMO.....	05
ABSTRACT.....	06
1 – Introdução.....	07
1.1 - Controle endócrino da gametogênese e maturação final.....	07
1.2 - Disfunções endócrinas em teleósteos.....	08
1.3 – Terapias hormonais.....	09
1.4 – A espécie <i>Epinephelus marginatus</i>	10
2- Objetivos.....	12
2.1 – Geral.....	12
2.2 – Específicos.....	12
3- Materiais e Métodos.....	13
3.1 - Delineamento Experimental.....	14
3.1.1 - Caracterização do perfil dos esteroides gonadais, FSH e diâmetro ovocitário em fêmeas de <i>E. marginatus</i> , em cativeiro, durante o ciclo anual	14
3.1.2 - Caracterização do perfil dos esteroides gonadais e diâmetro ovocitário em fêmeas de <i>E. marginatus</i> durante indução hormonal.....	17
3.1.3 - Experimento de indução hormonal com implante de estradiol.....	18
3.2 – Análises da gonadotropina plasmática - FSH	19
3.2.1 - Teste de reatividade do anticorpo	19
3.2.2 – Elisaimunoensaio para FSH.....	20
3.3 – Análises Estatísticas	21

4 – Resultados	22
4.1 – Caracterização do perfil dos esteroides gonadais, FSH e diâmetro ovocitário em fêmeas de <i>E. marginatus</i> , em cativeiro, durante o ciclo anual	22
4.1.1 – Análises dos ovócitos "frescos" e aferição do diâmetro	22
4.1.2 – Análise histológica dos ovócitos	25
4.1.3 – Concentração plasmática dos esteroides gonadais	26
4.1.4 – Análises da gonadotropina plasmática – FSH.....	28
4.2 – Caracterização do perfil dos esteroides gonadais e diâmetro ovocitário em fêmeas de <i>E. marginatus</i> durante a indução hormonal.....	30
4.2.1 – Fêmeas não vitelogênicas.....	30
4.2.2 – Fêmeas vitelogênicas.....	35
4.3 – Experimento de indução hormonal com implante de estradiol.....	37
5 – Discussão.....	39
6 – Conclusões.....	47
7 – Referências Bibliográficas.....	48

EPÍGRAFE

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”

Fernando Pessoa

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho...

A Deus, que permitiu que tudo pudesse ser realizado.

À minha noiva (esposa), Vanessa Ferreira da Silva, que me apoiou de diversas maneiras durante esta importante etapa de minha vida. Muito obrigado pelo carinho e paciência meu amor!

À minha filha, Luana Olivier de Paula Rodrigues, por compreender minhas ausências ao longo dos anos para iniciar e concretizar minha carreira profissional.

À minha mãe, Crenilda Patrício Gomes Rodrigues, pelo apoio na criação de minha filha e incentivo ao longo de minha trajetória profissional.

À professora, Renata Guimarães Moreira Whitton, por todos valiosos ensinamentos, pelas oportunidades oferecidas e pela grande amizade, que foram fundamentais na minha formação.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente agradeço ao nosso senhor Deus, pois foi para ele que sempre pedi forças, paciência e sabedoria que precisei durante esses anos.

- À Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton pela orientação, dedicação e ensinamentos durante esses anos de convivência. A concretização desse trabalho deve-se ao seu empenho, dedicação à vida profissional, paciência, persistência, e por ter me contagiado com sua empolgação do aprendizado, pois desta forma este trabalho pôde cada vez mais se aprofundar nos conhecimentos. Renata, te agradeço também, não só pela orientação na vida acadêmica, e sim por muitas vezes (desde a minha chegada em Mogi das Cruzes) contribuir com ensinamentos de ordem pessoal. Mais um trabalho termina, mas a amizade e admiração são eternas... Muito Obrigado mesmo. É enorme meu sentimento de gratidão por todo ensinamento e amizade.

- À Dra. Berta Levavi-Sivan por aceitar a parceria para dosagens das gonadotropinas em seu laboratório na *The Hebrew University of Jerusalem, Department of Animal Sciences* (Rehovot, Israel). Agradeço também a técnica de laboratório, Dra. Michal Shpilman Yacobovitz, que conduziu os procedimentos laboratoriais para obtenção dos dados.

- Ao professor Dr. Wensheng Li, da *School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University* (Guangzhou, China), por doar os anticorpos específicos de FSH e LH e enviá-los para as dosagens que foram conduzidas em Israel.

- Aos Diretores do Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar), Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva e Prof. Dr. Antônio Carlos Marques, por apoiarem o desenvolvimento do Projeto Garoupa nas instalações do CEBIMar.

- À professora Dra. Sônia Regina Panzarini e sua aluna Vanessa Ferreira da Silva do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia da UNESP (Araçatuba, SP) por ceder gentilmente os implantes de estradiol que foram utilizados nesse trabalho.

- Aos técnicos, professores e funcionários do CEBIMar: Zeilton, Elso (padrinho), Eduardo, Joseph (em memória), Elias, Luciano, Dudu, Reinaldo, Fábio, Graça, Camila, Cleide, Simone, Wagner, Emerson, professores Álvaro e Augusto, por contribuírem em diversas maneiras para a condução dos experimentos e manutenção dos animais.

- À equipe do Projeto Garoupa: Jaboti, Paulo, Bruno, Mariana, Jéssica e Renata pela convivência diária e auxílios que vão desde as ajudas em coletas, manutenção dos animais até aos diversos momentos divertidos e tensos que passamos juntos. Meu Muito Obrigado a cada um!! Foi muito bom ter trabalhado com vocês!!

- Aos funcionários da Pós-Graduação do CAUNESP, em especial à Veralice e David pelas diversas ligações, ajudas e serviços burocráticos... muito obrigado!!

- Aos amigos do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA): Aline, Amanda, Bruno, Carlos Tolussi (Kadu), Carlos E. O. Garcia (Jaboti), Cristiéle, Paulo, Renato, Roberta, professora Renata, Mariana, Jéssica, Bianca, Andreone, Gabriela, Raisal, Walquiria, e Vagner (técnico) pela convivência e auxílios no laboratório e pela amizade durante esses anos... foram muitos momentos inesquecíveis que serão eternamente lembrados.

- Aos amigos do CEBIMar e Barequeçaba: Serginho, Sol, Pedro, Mogli, Saião, Jaqueline, Jiraya, Pola, Maysa, Renato, Nilvea, Fred, Fernando, Padrinho Elso,

Dona Vanda e Nivaldo pela amizade e por estarem sempre presentes nos diversos momentos de lazer agradáveis que passamos juntos. Obrigado a todos pela convivência e parceria durante esses anos!

- Ao grande cinegrafista e amigo Guilherme Tom que durante os anos de duração desse projeto nos presenteou com excelentes filmes editados sobre o Projeto Garoupa.

- Aos amigos, Renato e Serginho, pela sincera amizade e por sempre disponibilizarem os pernoites em suas casas nos momentos de idas e vindas de experimentos e laboratórios... sem palavras por tudo!

- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa (Processo: 2011/24074-8) e auxílio (Processo 2011/50407-4), possibilitando a realização deste trabalho.

- Agradeço à FIPERJ, em especial, Carolina Marchet Lisboa (chefe de escritório), Dr. Rodrigo Takata (Coordenador de Pesquisa) e Augusto Pereira (Diretor de Pesquisa e Extensão), por apoiarem o desenvolvimento final desse trabalho durante o último ano em que foi efetivado como pesquisador no cargo de servidor público do Estado do Rio de Janeiro.

- A todos da minha grande família, MUITO OBRIGADO!!! Essa vitória não é só minha, mas também de vocês. Por todo o sacrifício, pela distância, e apoio durante esses anos.

Mais uma vez, meu muito obrigado a todos que contribuíram para esse trabalho,

Jandyr Filho (Jajá)

APOIO FINANCEIRO

FAPESP, bolsa de doutorado, Processo número 2011/24074-8;
Auxílio Regular, Processo 2011/50407-4.

RESUMO

Muitos peixes de interesse na aquicultura, dentre eles a garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, exibem disfunções reprodutivas devido ao confinamento, que por sua vez, afetam o eixo hipotálamo–hipófise–gônadas que controla os processos reprodutivos em vertebrados. O objetivo deste trabalho foi estudar o perfil dos esteroides gonadais e hormônio folículo estimulante (FSH) ao longo do ciclo reprodutivo, durante a reprodução induzida e na estimulação da vitelogênese em fêmeas de *E. marginatus* em cativeiro. Durante o ciclo anual a concentração de andrógenos não se alterou. Por outro lado, o nível plasmático de 17 β -estradiol (E₂) foi significativamente superior no período final, em comparação com o período inicial de confinamento. Concentrações plasmáticas de 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP) foram significativamente mais elevadas nos meses de outubro, novembro e janeiro em relação aos meses de maio, junho, julho e agosto, e os níveis de FSH plasmáticos foram superiores em janeiro quando comparados aos meses de junho, julho, agosto e setembro, porém, os ovócitos permaneceram na fase de crescimento primário durante todo o ciclo anual. No primeiro experimento de indução hormonal (fêmeas não vitelogênicas) apenas a concentração de 17 α -OHP aumentou após a estimulação com gonadotropina coriônica humana (hCG), mas este aumento não se refletiu no diâmetro dos ovócitos e ovulação. No segundo experimento, fêmeas vitelogênicas capturadas no ambiente natural foram induzidas e ovularam no período de 24 a 32 horas após a terceira dose de hCG, apresentando dois padrões diferentes de desova: a desova total ou em pequenos lotes, e os níveis plasmáticos de E₂, testosterona (T) e 17 α -OHP apresentaram aumento progressivo ao longo dos períodos amostrais. No experimento com implantes de estradiol houve aumento deste estrógeno no plasma, mas sem desencadear a vitelogênese. Por fim, consideramos que o uso de hCG é viável para induzir a maturação final e ovulação em fêmeas vitelogênicas e sugerimos um período aproximado de 3 anos de aclimatação dos animais mantidos em condições de cativeiro para que possa ocorrer o início da vitelogênese.

Palavras chaves: esteroides gonadais, gonadotropinas, ciclo anual, reprodução induzida, diâmetro ovocitário.

ABSTRACT

Many fish of interest in aquaculture, including the dusky grouper, *Epinephelus marginatus* exhibit reproductive dysfunctions due to confinement, which in turn affect the hypothalamus-pituitary-gonadal axis that controls the reproductive processes in vertebrates. The aim of this study was to evaluate the profile of gonadal steroids and follicle-stimulating hormone (FSH) throughout the reproductive cycle, during the induced spawning and vitellogenesis induction in *E. marginatus* females in captivity. During the annual cycle, the concentration of androgens did not change. Moreover, the plasma levels of 17 β -estradiol (E₂) was significantly higher in the end of the period compared with the initial period of confinement. Plasma concentrations of 17 α -hydroxyprogesterone (17 α -OHP) were significantly higher in October, November and January than May, June, July and August, and serum FSH levels were higher in January compared to June, July, August and September, however, the oocytes remained at the stage of primary growth throughout the annual cycle. In the first hormonal induction experiment (non vitellogenic females) only 17 α -OHP increased after stimulation with human chorionic gonadotropin (hCG), however this increase was not reflected in the diameter of oocytes and ovulation. In the second experiment, vitellogenic females captured in the natural environment were induced to spawning and ovulated within 24 to 32 hours after the third dose of hCG, showing two different patterns of spawning: the total spawning or spawning in small batches, and plasma levels of E₂, testosterone (T) and 17 α -OHP presented a progressive increase over the sampling periods. In the experiment with estradiol implants, an increase of this estrogen was observed, but vitellogenesis was not triggered. Finally, we consider that the use of hCG is viable to induce the final maturation and ovulation in vitellogenic females and we suggest a period of about 3 years of acclimatization of the animals in captivity conditions to trigger vitellogenesis.

Keywords: gonadal steroids, gonadotropins, annual cycle, induced reproduction, oocyte diameter.

1 – Introdução

1.1 - Controle endócrino da gametogênese e maturação final

De uma forma geral, a grande maioria dos peixes apresenta o processo reprodutivo modulado pelos fatores ambientais (por exemplo, a temperatura, o fotoperíodo, a pluviosidade, entre outras variáveis), que são captados pelos sistemas sensoriais (olhos, pineal, narinas, receptores cutâneos, entre outros), analisados e convertidos em sinais eletroquímicos e transmitidos via neurônios sensoriais até o hipotálamo, que por sua vez, desencadeiam todos os eventos fisiológicos que conduzirá a uma reprodução bem sucedida (Blázquez & Somoza, 2010; Levavi-Sivan *et al.*, 2010; Mylonas *et al.*, 2010; Trudeau, 2006; Zohar *et al.*, 2010).

O controle fisiológico da reprodução, desencadeado pela ação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, tem início com a síntese e liberação do neuro-hormônio conhecido como GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas) no hipotálamo. O GnRH estimula a hipófise a liberar as gonadotropinas (GtHs), FSH (hormônio folículo-estimulante) e LH (hormônio luteinizante), que irão por sua vez estimular a produção dos esteroides gonadais (Zohar *et al.*, 2010). No entanto, outros neuromoduladores do processo reprodutivo podem estimular e/ou inibir a síntese e liberação da GtHs, atuando principalmente no hipotálamo e secundariamente na hipófise, como exemplo, a dopamina, a kisspeptina e o hormônio inibidor de gonadotropinas (GnIH) (Dufour *et al.*, 2005; Taranger *et al.*, 2010; Zohar *et al.*, 2010).

O FSH, nas fêmeas, estimula a conversão do colesterol em testosterona nas células da teca dos folículos ovariano. A testosterona é aromatizada (pela enzima P450_{aromatase}) e convertida em 17 β -estradiol (E₂), nas células foliculares. O E₂ é o principal esteroide produzido na fase de maturação gonadal de fêmeas e sua ação é estimular o fígado a sintetizar a fosfoglicolipoproteína conhecida como vitelogenina (Lubzens *et al.*, 2010), que é captada pelos ovócitos (ação mediada pelo FSH) e incorporada na formação do vitelo, promovendo a maturação dos gametas nos ovários. O LH estimula a síntese de 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -

OHP), que é convertido em $17\alpha,20\beta$ -dihydroxi-4-pregnen-3-one (17α - 20β -DHP), conhecido como o hormônio esteroide indutor da maturação final dos ovócitos (Lubzens *et al.*, 2010). Nos machos, o controle da maturação dos gametas é semelhante, sendo, a testosterona (T) e a 11-cetotestosterona (11-KT) os esteroides mais importantes na maturação (Jiang *et al.*, 2003).

1.2 - Disfunções endócrinas em teleósteos

Semelhante à maioria dos animais silvestres quando mantidos em cativeiro, muitos teleósteos de interesse comercial na aquicultura exibem disfunções reprodutivas devido ao confinamento. Estas disfunções provavelmente resultam da combinação do estresse induzido pelo cativeiro e da ausência do ambiente de desova “natural” (Pankhurst & Van der Kraak, 1997; Yaron, 1995). Esses problemas são geralmente mais graves em fêmeas, e segundo Zohar & Mylonas (2001) as disfunções reprodutivas em cativeiro podem ser classificadas em três tipos. O primeiro, e mais grave problema é exemplificado nas enguias, nas quais falham completamente a vitelogênese e a espermatogênese quando machos e fêmeas são mantidos em cativeiro. O segundo tipo de disfunção reprodutiva é a ausência da maturação final dos ovócitos, o mais comum encontrado na aquicultura, com a vitelogênese ocorrendo normalmente, mas ao entrar na estação de desova os ovócitos vitelogênicos não completam a maturação final e ovulação, tornando-se atrésicos, o que normalmente ocorre nos peixes de piracema (potamódromos). O terceiro tipo de disfunção reprodutiva, encontrado em fêmeas no cativeiro, é a ausência da desova no final do ciclo reprodutivo. Nas espécies que exibem este problema os ovócitos iniciam normalmente a vitelogênese, ocorre a maturação final e a ovulação em resposta aos estímulos ambientais e fisiológicos, mas os ovócitos ovulados não são liberados para a água, disfunção observada em trutas.

Estas disfunções reprodutivas em fêmeas, quando mantidas em cativeiro, parecem estar intimamente ligadas ao funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, descrito anteriormente. Estudos com fêmeas adultas de *Epinephelus marginatus*, a garoupa-verdadeira, em cativeiro relatam dois tipos de disfunções reprodutivas, com fêmeas que não iniciam a fase vitelogênica do

desenvolvimento ovocitário e fêmeas que iniciam a vitelogênese, porém não completam a maturação final dos ovócitos e a ovulação, mesmo quando mantidas sob as mesmas condições (Marino *et al.*, 2003).

1.3 – Terapias hormonais

Terapias hormonais para induzir a maturação dos ovócitos, ovulação e desova em peixes têm sido aplicadas na reprodução bem antes do melhor entendimento nas falhas do eixo reprodutivo. O primeiro método aplicado foi a “hipofisação”, no qual usa-se o extrato de hipófises (contendo gonadotropinas) obtidas de peixes sexualmente maduros durante as estações de desova. Esta técnica é utilizada para induzir a maturação e/ou ovulação em indivíduos da mesma espécie ou espécies diferentes daquela doadora da hipófise (Migita *et al.* 1952; Von Ihering, 1937).

Com o surgimento das técnicas de isolamento de proteínas, tornou-se possível a purificação do LH (Donaldson, 1973; Yaron, 1995), junto com a gonadotropina coriônica humana (hCG), que apresenta um alto grau de homologia estrutural com LH (Ludwig *et al.*, 2002). Nas últimas décadas, após a descoberta do GnRH (Schally, 1978) e a síntese de análogos de GnRH mais potentes (Crim & Bettles, 1997), as terapias de indução a desova passaram a ser realizadas com o uso deste neuro-hormônio. Este fato foi importante pois o GnRH e seus análogos agem no nível mais elevado do eixo do controle neuroendócrino da reprodução estimulando a síntese de FSH e LH da espécie, podendo assim agir de forma mais integrada tanto nos processos reprodutivos quanto em outras funções associadas. Atualmente, GnRHs e GtHs são usados nas terapias de indução à desova, sendo que as GtHs tem a vantagem de que a sua eficácia não depende da necessidade de uma hipófise ativa ou responsiva (Mylonas *et al.*, 2010).

1.4 – A espécie *Epinephelus marginatus*

A garoupa verdadeira *E. marginatus* (Lowe, 1834) (Serranidae, Epinephelinae) é uma espécie de teleósteo hermafrodita sequencial protogínico característico do litoral rochoso, que vive desde águas rasas até profundidades de mais de 200 metros. Sua distribuição é ampla ocorrendo no litoral sudeste do Brasil, assim como no mediterrâneo e na costa leste do Oceano Atlântico (Barreiros, 1998). Segundo Andrade *et al.*, (2003) a primeira maturação sexual ocorre em indivíduos com massa corpórea média de 2 kg com aproximadamente 5 anos de idade e a inversão sexual, ocorre em indivíduos acima dos 10 a 15 kg de massa corpórea e acima dos 10 anos de idade (Barreiros, 1998).

A forte pressão de pesca aliada à falta de planejamento de manejo desta espécie, a maturação sexual tardia dos machos, a agregação na época reprodutiva e a ampla utilização na culinária mundial levaram à inclusão de *E. marginatus* na lista da IUCN (2015) como espécie sobre-explotada no mundo e recentemente, mais especificamente, no estado de São Paulo (São Paulo, 2008; Rodrigues-Filho *et al.*, 2009). Mesmo nestas condições críticas de conservação, nenhuma providência legal foi estabelecida para minimizar os danos e preservar esta espécie. Esta situação leva à busca de estratégias mitigadoras de conservação e, com seu estoque natural ameaçado, o repovoamento surge como opção direta para a manutenção desta espécie.

Para minimizar o problema da dificuldade de captura e conseqüentemente, disponibilização de machos no cativeiro, foram definidos alguns protocolos de inversão sexual em espécies da família Serranidae. Uma alternativa para a inversão do sexo é retomar a via de síntese dos esteroides gonadais, destacando aqui o papel da enzima aromatase, que converte a testosterona em estradiol, tendo assim um importante papel na manutenção do sexo nos vertebrados. O conhecimento desta via possibilitou a utilização dos chamados inibidores de aromatase (IA), que inibem a ação da aromatase, diminuindo a produção de E₂ em *E. merra* (Bhandari *et al.*, 2004) levando a um aumento na produção de T e conseqüentemente a inversão do sexo feminino para o masculino. Estudos recentes com a utilização de IA em *E. marginatus* promoveram um aumento da concentração plasmática dos andrógenos (T e 11KT) e uma síntese inalterada de E₂, acompanhados por uma degeneração de ovócitos com subsequente

proliferação de células germinativas espermatogênicas, determinando a inversão sexual em indivíduos imaturos (Rodrigues-Filho, 2010) e adultos (Garcia *et al.*, 2013). Após o sucesso na inversão do sexo, o próximo passo a ser estudado é o processo reprodutivo, que só é possível com a estimulação hormonal em alguns pontos do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

Marino *et al.*, (2003) induziram garoupas verdadeiras à ovulação utilizando um sistema de implantes de análogos de GnRH (GnRHa) durante o período reprodutivo da espécie, sendo este protocolo de implante considerado adequado para induzir a maturação final e ovulação de ovócitos vitelogênicos ao longo dos dias de implantação, considerando-se que a garoupa tem múltiplas desovas em um período limitado. No entanto, sabe-se que não são todas as fêmeas que avançam na fase vitelogênica do ciclo quando em cativeiro, e mesmo dentre aquelas que atingem esta fase, a reprodução induzida não resulta em sucesso para 100% das fêmeas com implantes hormonais. No entanto, esta técnica de reprodução induzida é na maioria das vezes realizada sem o acompanhamento e entendimento do real papel fisiológico deste tratamento hormonal em fêmeas vitelogênicas de *E. marginatus* e principalmente, quais seriam as possíveis causas dos resultados negativos na ovulação de algumas fêmeas.

Considerando-se o fato de que algumas fêmeas apresentam falhas em atingir a vitelogênese e outras ainda, não respondem ao tratamento de reprodução induzida, mesmo estando na fase vitelogênica do ciclo, considera-se que a análise hormonal destes animais será de grande importância para interpretar os resultados negativos que são comuns nas fêmeas em cativeiro.

Sendo assim, a presente tese tem como objetivo entender as bases fisiológicas do controle endócrino no ciclo reprodutivo de *E. marginatus*. Desta forma, quatro hipóteses foram testadas: 1) As variações dos esteroides gonadais e do FSH ao longo do ciclo anual refletem nas fases de desenvolvimento dos ovócitos em fêmeas adultas mantidas no cativeiro; 2) A indução hormonal com hCG em fêmeas adultas não vitelogênicas desencadeia uma cascata hormonal dos esteroides gonadais e induz o avanço da vitelogênese; 3) Após a indução hormonal com hCG em fêmeas vitelogênicas os níveis plasmáticos dos esteroides gonadais aumentam ocorrendo a ovulação; 4) O implante de pellets de estradiol em fêmeas adultas não vitelogênicas resulta no aumento de estradiol, promovendo a vitelogênese.

2- Objetivos

2.1 – Geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o perfil de esteroides gonadais e do FSH ao longo do ciclo reprodutivo e durante a reprodução induzida de fêmeas de *E. marginatus* em cativeiro.

2.2 – Específicos

- Foi analisada a concentração plasmática dos esteroides gonadais (E₂, T, 11-KT e 17 β -OHP) e do FSH de fêmeas adultas durante o ciclo anual dos animais mantidos no cativeiro. Além disso, foi mensurado o diâmetro ovocitário e identificadas as fases de desenvolvimento dos ovócitos durante as quatro estações do ano;

- Foi analisada a concentração plasmática dos esteroides gonadais (E₂, T, 11-KT e 17 α -OHP), mensurado o diâmetro ovocitário e identificadas as fases de desenvolvimento dos ovócitos após a técnica de reprodução induzida com hCG em fêmeas adultas vitelogênicas e não vitelogênicas.

- Foi analisada a concentração plasmática de estradiol e mensurado o diâmetro ovocitário após a implantação de *pellet* de estradiol em fêmeas adultas não vitelogênicas.

3- Materiais e Métodos

Para cumprir os objetivos delineados e testar as hipóteses levantadas foram definidos três experimentos, (1) caracterização do perfil dos esteroides gonadais, FSH e diâmetro ovocitário em fêmeas de *E. marginatus*, em cativeiro, ao longo do ano; (2) e durante o processo de reprodução induzida também em cativeiro em fêmeas vitelogênicas e não vitelogênicas; (3) Suplementar fêmeas de *E. marginatus* com estradiol para estimular a vitelogênese.

Todos os experimentos foram conduzidos na base experimental do Projeto Garoupa localizado no Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar/USP) (Fig. 1), localizada no litoral norte do estado de São Paulo, no município de São Sebastião. Em todas as etapas experimentais os animais foram coletados por pescadores artesanais do município de São Sebastião nas ilhas de Montão de Trigo, Búzios e Toque Toque Grande, e dentro do canal de São Sebastião / Ilha Bela. As coletas desses exemplares foram autorizadas pelo SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) pertencente ao MMA (Ministério do Meio Ambiente) através da autorização para atividades com finalidade científica número 33668-3.



Figura 1: Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar/USP). São Sebastião, litoral norte do estado de São Paulo. Seta branca mostrando a estufa onde estão localizados os tanques.

3.1 - Delineamento experimental

3.1.1 - Caracterização do perfil dos esteroides gonadais, FSH e diâmetro ovocitário em fêmeas de *E. marginatus*, em cativeiro, durante o ciclo anual

Este experimento foi iniciado em outubro de 2012 e foi conduzido até o mês de setembro de 2013, totalizando doze coletas mensais do plasma sanguíneo ao longo de quatro estações do ano. Foram utilizadas quatorze fêmeas adultas com massa corpórea variando entre 3 e 12 kg, marcadas individualmente com chips eletrônicos (*transponders*, TROVAN[®]) e distribuídas em dois tanques circulares (Sansuy[®]) de 10 m³ (Fig. 2) (duplicata) na densidade de 5 Kg/m³ com sete animais em cada tanque. Os peixes foram mantidos em água com aeração constante, fotoperíodo natural e renovação diária da água do mar, de 50 a 100%. Foram alimentados três vezes por semana até a saciedade, sendo ofertado ao longo do ano, sardinha, lula, polvo, bonito e siri. Diariamente a temperatura da água e a concentração de oxigênio dissolvido (OD) foram medidos com o oxímetro YSI 55.



Figura 2: Tanques circulares de 10 m³ utilizados para a manutenção dos animais do experimento de acompanhamento do ciclo anual.

Nas coletas mensais os animais foram anestesiados com benzocaína, (1,5 g / 10L água do mar), previamente diluída em etanol, e amostras de sangue retiradas da vasculatura caudal (cerca de 4 ml) utilizando-se agulhas e seringas previamente heparinizadas (Heparina Sódica HEPAMAX-S[®] - 5000 UI/mL). O

sangue retirado foi transferido para tubos heparinizados e centrifugados a 2500 rpm por 7 minutos, sendo o plasma separado em alíquotas, colocado em criotubos e armazenado em gelo seco para posteriormente serem estocados em freezer - 80° C e analisados.

A concentração plasmática dos esteroides E₂, 17 α -OHP, T e 11-KT foram determinadas por elisaimunoensaio (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – ELISA), com o uso de kits comerciais de acordo com as especificações técnicas do fabricante (E₂, T e 11-KT: Cayman Chemical Company, Michigan, USA e 17 α -OHP: Kit IBL International GMBH, Hamburg, Germany). As leituras foram realizadas em microplacas (Spectra MAX 250) em um comprimento de onda de 450 nm para o hormônio 17 β -estradiol, 17 α -OHP e testosterona, e de 405 nm para 11-KT. O limite de detecção do ensaio foi 15 pg/ml para E₂, 30 pg/ml para 17 α -OHP e T, 1.3 pg/ml para 11-KT. Os coeficientes de variação (CVs) intra e interensaio no plasma da garoupa foram respectivamente 6,8 % e 9,5% para E₂, 7,4% e 15,1% para 17 α -OHP, 9,8% e 19,1% para T e 9,2% e 8,6% para o 11-KT (Garcia *et al.* 2013).

A cada estação do ano, iniciando-se no momento da primeira coleta mensal de sangue, os dados morfométricos e ponderais foram registrados e uma amostra dos ovócitos foi retirada por uma cânula (0,8 a 1,2 mm) introduzida no orifício urogenital do animal anestesiado. Imediatamente após essa canulação uma amostra dos ovócitos “frescos” (*in natura*) foi examinada sob estereomicroscópio (Leica – modelo S6D) e fotografados com auxílio de um sistema computadorizado de captura de imagens (Leica DFC 295; *Leica Application Suite Professional* – LAS – 3.6) para aferir o diâmetro dos ovócitos (Fig. 3), sendo visualizada e realizada a medição de 8 a 10 ovócitos maiores de todo o campo visual da lâmina contendo os ovócitos recém canulados para posteriores aferições do diâmetro dos ovócitos. Após a captura das imagens dos ovócitos, primeiramente foi realizada uma medição no sentido horizontal e vertical do ovócito, realizando-se uma média para cada ovócito e posteriormente uma média para cada amostra. Outra parte da amostra dos ovócitos obtidos por canulação foi fixada em formol tamponado por 24 horas e após esse período foi transferida e preservada em etanol 70% para as análises histológicas. É importante destacar que optou-se pela aferição do diâmetro ovocitário apenas

uma vez a cada estação e não a cada mês, para minimizar os traumas causados pela canulação.



Figura 3: *Epinephelus marginatus*. Aferição do diâmetro dos ovócitos frescos (*in natura*) no sentido horizontal e vertical.

As análises histológicas foram conduzidas no Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA), Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Primeiramente, os ovócitos preservados foram desidratados por série progressiva de etanol, infiltrados e incluídos em paraplast, cortadas ao micrótomo (Leica RM2255) a uma espessura de 5 µm e corados com hematoxilina e eosina seguindo os procedimentos de rotina para análises de microscopia de luz. Os cortes foram analisados em microscópio (Leica DM 1000) e as imagens foram capturadas utilizando um sistema computadorizado de captura de imagens (Camera Leica DFC 295 *Software Leica Application Suite Professional* – LAS V.3) para identificação das fases do desenvolvimento ovocitário segundo a classificação descrita por Grier *et al.*, (2009).

Após cada coleta mensal, os animais foram mantidos em 3 caixas de 2.000 litros por 24 horas enquanto era realizado o manejo sanitário dos tanques, e ao

retornarem ao tanque experimental os peixes foram mantidos por 5 minutos em água doce para o manejo preventivo contra o ectoparasita *Neobenedenia melleni* (MacCallum, 1927) (Monogenea: Capsalidae), comum em cultivos de serranídeos. Após este manejo, foram ofertadas vitaminas na forma de Premix (F308005AP, Nutron) em cápsulas (350 mg) introduzidas em pedaços de sardinhas, sendo fornecido 2 cápsulas por peixe durante as duas primeiras alimentações após as coletas mensais e manejo preventivo.

3.1.2 - Caracterização do perfil dos esteroides gonadais e diâmetro ovocitário em fêmeas de *E. marginatus* durante indução hormonal

Durante o período reprodutivo foram realizados dois experimentos. Na estação reprodutiva de 2012/2013 foi realizado o primeiro experimento de indução hormonal, utilizando-se fêmeas com diâmetro dos ovócitos abaixo de 300 µm (limite de tamanho relatado na literatura para ovócitos não vitelogênicos), e durante a estação reprodutiva de 2013/2014 foi realizado o segundo experimento de indução hormonal com fêmeas com o diâmetro dos ovócitos de 850 µm, mensurados conforme o método já descrito.

Inicialmente foi realizado um teste piloto durante a estação reprodutiva para certificar-se do mês de realização do experimento, a resistência dos animais à coleta sequencial de sangue e ainda, qual seria o mínimo volume de sangue necessário para as análises hormonais. O experimento piloto foi conduzido em dezembro de 2012 com fêmeas não vitelogênicas que apresentavam ovócitos com o diâmetro inferior a 300 µm, levando em consideração que as fêmeas não se tornaram vitelogênicas em cativeiro.

No primeiro experimento foram utilizadas seis fêmeas de 2 Kg, divididas em dois grupos: 1) hCG: fêmeas induzidas com duas doses de 1000 UI de hCG/Kg (Ovidrel®, Serono, Bari, Itália) totalizando 2000 UI/Kg; 2) Controle: fêmeas induzidas com soro fisiológico (0,9%) (0,5 ml/peixe). As doses (hCG e soro) foram aplicadas com intervalo de 24 horas, na cavidade abdominal logo abaixo da nadadeira peitoral (Spedicato *et al.*, 1995). Durante o experimento os peixes foram mantidos em caixas de 2.000 litros, com circulação constante, fotoperíodo natural e temperatura de $21,5^{\circ} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ (média \pm desvio padrão). Foram realizadas coletas de sangue e ovócitos no período inicial (zero), 24, 48 e 72 horas após a

primeira indução. A coleta de sangue após 24 horas da primeira indução foi realizada no mesmo momento da aplicação da segunda dose do hormônio. Os métodos de coleta de sangue e ovócitos foram os mesmos descritos anteriormente.

O segundo experimento, realizado durante a estação reprodutiva 2013/2014 foi conduzido com três fêmeas vitelogênicas recém capturadas no ambiente natural. As fêmeas foram induzidas com três doses de 1000 UI de hCG/KG com intervalos de 20hs entre a primeira e segunda dose. A terceira dose foi aplicada 34hs após a segunda dose. O sangue foi coletado no período inicial, durante a segunda e a terceira dose, e após a ovulação. A aplicação da terceira dose de hCG foi necessária pois as fêmeas não responderam à ovulação após a segunda dose, como esperado, considerando o protocolo de indução estabelecidas pelo Projeto Garoupa no CEBIMar (Garcia *et al.*, 2013).

3.1.3 - Experimento de indução hormonal com implante de estradiol

Em janeiro de 2014, durante a estação reprodutiva da espécie, foi realizado o experimento de indução hormonal com implantes de estradiol de longa duração. Foram utilizadas 15 fêmeas, cujos dados biométricos corroboram com a idade da primeira maturação sexual. Estas fêmeas foram distribuídas em 3 grupos com 5 animais: 1) grupo controle: animais implantados com pellets contendo óleo de milho; 2) grupo experimental com pellets com concentração de 150 µg/kg de estradiol; 3) grupo experimental com pellets com concentração de 300 µg/kg de estradiol. Esse experimento foi realizado durante 30 dias e as coletas de plasma e as amostras dos ovócitos foram obtidas no período inicial, 15 e 30 dias após a implantação dos pellets e todos os animais foram marcados individualmente com chips eletrônicos (*transponders*, TROVAN®).

Os pellets (1,5 cm) foram confeccionados com Silastic (*Dow Corning Cat* n°508-006; Diâmetros: 0.058 ID (1,47 mm); 0.077 OD (1,96 mm)) (Fig. 4) de acordo com protocolo estabelecido por Luvizoto *et al.* (2010). Para a confecção de cada pellet, uma das extremidades foi colada com silicone e em seguida foi adicionado volume de preenchimento de 8,4 mm³ de óleo milho (grupo controle). Nos grupos experimentais foi adicionado aos pellets o mesmo volume de óleo de milho, E₂ (17β-estradiol/Sigma-Aldrich) na concentração de 300µg/mm³. Os

animais do grupo 2 receberam 1 pellet a cada 2kg de massa corpórea (150 µg/kg) e os animais do grupo 3 receberam 2 pellets a cada 2 kg (300 µg/kg). Após o preenchimento do Silastic, a outra extremidade foi colada com silicone. Os pellets permaneceram em secagem por 24 horas, e após esse período, os animais foram anestesiados com benzocaína (1,5 g / 10L água do mar, previamente diluída em etanol) e os pellets foram implantados na cavidade abdominal.



Figura 4: *Epinephelus marginatus*. Pellets de estradiol confeccionados com Silastic (*Dow Corning Cat*) (escala em cm).

3.2 – Análises da gonadotropina plasmática - FSH

3.2.1 - Teste de reatividade do anticorpo

Para estas análises, seis hipófises de *E. marginatus* de animais recém capturados no ambiente natural foram coletadas, armazenadas em tubos *ependorfs* contendo etanol 95-100% e estocadas a -20°C. Posteriormente, as hipófises foram homogeneizadas em tampão PBS 0,01 M pH 7,0 contendo 0,02 M de fluoreto de fenilmetilsulfonilo e EDTA 0,05 M, utilizando 0,5-1 ml/hipófise. O homogeneizado foi agitado durante 30 minutos a 4°C e centrifugado a 15.000 x g durante 30 minutos. O sobrenadante resultante foi utilizado como extrato de hipófise que em seguida foi liofilizado. Após estas etapas, as hipófises liofilizadas

foram enviadas ao *Department of Animal Sciences, The Hebrew University of Jerusalem* (Rehovot, Israel) em colaboração com a Dra. Berta Levavi-Sivan, e realizou-se o teste para o grau de similaridade do anticorpo desenvolvido para espécie do mesmo gênero da garoupa utilizada neste estudo, *Epinephelus coioides* (Chen *et al.* 2012).

O recombinante da subunidade β do FSH (rgFSH β) (GenBank Accession No. AY553982 and AY679087) da garoupa foi gentilmente doado pelo professor Dr. Wensheng Li do *Institute of Aquatic Economic Animals, Sun Yat-Sen University*, em Guangzhou, China. O rgFSH β foi produzido por *Pichia pastoris* e o anticorpo policlonal foi produzido em coelhos da espécie *New Zealand*, segundo protocolo utilizado por Chen *et al.* (2012).

Para os cálculos de dados linearidade do anticorpo do ELISA, as curvas sigmoidais foram linearizados usando a transformação logit, onde $\text{logit}(B / B_0) = \log [r / (1 - r)]$, onde $r = B / B_0$, B representa a ligação em cada ponto, e B_0 o máximo obrigatório.

3.2.2 – Elisaimunoensaio para FSH

As análises de ELISAs competitivos para determinações dos níveis plasmáticos de FSH foram conduzidas no laboratório da professora Dra. Berta Levavi-Sivan de acordo com protocolo estabelecido por Aizen *et al.* (2007). A técnica consiste na utilização de anticorpos primários específicos da subunidade β e o recombinante para o revestimento da microplacas de ELISA, e o recombinante de FSH para determinação da curva padrão. Após esta etapa as microplacas (Nunc-Immuno™ Plates; Nunc, Dinamarca) foram revestidas com gFSH e incubadas durante a noite. No dia seguinte, as placas foram lavadas e bloqueadas com albumina de soro bovino (BSA, Sigma, Ness Ziona, Israel) para reduzir a marcação de fundo.

As amostras e padrões foram primeiro pré-incubada durante a noite com os anticorpos primários. Após a pré-incubação, cada amostra foi dispensada nas cavidades dos poços e incubou-se durante 3 horas em temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas com PBST e incubadas novamente com anticorpos secundários durante 2 horas em temperatura ambiente e posteriormente, lavadas com PBST. A presença de complexos de enzima foi

visualizada pela adição substrato de peroxidase tetrametilbenzidina (TMB) (KPL, Zotal, Israel). A reação foi conduzida em escuridão total e foi parada após 15 min com solução *stop* TMB. Após estas etapas a absorbância foi lida em 450 nm, utilizando um Leitor Espectro II ELISA (SLT, Salzburg, Áustria).

3.3 – Análises Estatísticas

No experimento do ciclo anual do perfil hormonal, as concentrações plasmáticas de cada hormônio foram comparadas entre cada tanque (duplicatas) utilizando-se o teste *t-Student* e posteriormente submetidas à análise de variância (ANOVA) (*One Way Analysis of Variance*) seguida pelo teste *Dunn's* ou Kruskal-Wallis dependendo da distribuição normal dos dados, para as comparações entre os diferentes meses de coletas. Nos experimentos de indução hormonal os valores das concentrações dos hormônios foram comparados utilizando-se Análise de Variância (*Repeated Measures (RM) ANOVA*), por ser tratar de dados obtidos dos mesmos indivíduos ao longo do tempo. Como no experimento realizado ao longo do ciclo anual houve a mortalidade de alguns animais, optou-se por não realizar o ensaio RM. Os diâmetros dos ovócitos foram comparados entre as estações do ano utilizando-se o teste *t-Student*. As comparações do diâmetro dos ovócitos durante o experimento de indução foram submetidas à Análise de Variância (*Repeated Measures (RM) ANOVA*) seguidas pelo teste *Dunn's* ou Kruskal-Wallis. No experimento com implantes de estradiol foi realizada a Análise de Variância *Two way ANOVA* (variáveis: dose e tempo) seguida pelo teste de Tukey, com os dados dos níveis plasmáticos de estradiol e diâmetro dos ovócitos. Em todas as análises, as diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$. Os dados apresentados para as análises dos esteroides gonadais e dos diâmetros estão exibidos como média \pm EPM. Estas análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico *SigmaStat* para *Windows* (versão, 3.10, *Copyright*).

4 – Resultados

4.1 – Caracterização do perfil dos esteroides gonadais, FSH e diâmetro ovocitário em fêmeas de *E. marginatus*, em cativeiro, durante o ciclo anual

Em primeiro lugar, é importante destacar que variáveis importantes no controle da qualidade de água, como temperatura e concentração de oxigênio dissolvido foram monitoradas. Na tabela 1 estão apresentados os parâmetros mensais dos registros diários da temperatura ($T^{\circ} C$) e oxigênio dissolvido (mg/L) da água. A temperatura variou de $22,2 \pm 0,8$ a $25,6 \pm 1,4$ $^{\circ}C$ nos meses da primavera, verão e outono, e nos meses do inverno variou de $20,4 \pm 1$ a $19,0 \pm 1$ $^{\circ}C$ ($P < 0,001$). A concentração de oxigênio dissolvido variou de $7,7 \pm 0,7$ a $8,3 \pm 0,6$ mg/L nos meses com a temperatura mais elevada e aumentou durante o inverno, variando de $9,5 \pm 0,7$ a $11,0 \pm 0,9$ mg/L ($P < 0,001$).

4.1.1 – Análises dos ovócitos "frescos" e aferição do diâmetro

Durante as análises microscópicas dos ovócitos "frescos", após a canulação, foi observado o citoplasma translúcido, núcleo central bem desenvolvido e numerosos nucléolos em todas as estações coletadas (Fig. 5 - *insert*). Os valores médios registrados nas aferições do diâmetro ovocitário "frescos" estão apresentados na figura 6 para todas as estações, havendo diminuição do diâmetro no verão em relação à primavera ($P = 0,021$).

Tabela 1: Concentração de oxigênio dissolvido e temperatura da água, registradas nos meses da primavera de 2012 ao inverno de 2013 (Média ± DP).

	Primavera/2012			Verão/2013			Outono/2013			Inverno/2013		
	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maiο	Junho	Julho	Agosto	Setembro
Oxigênio dissolvido (mg/L)	7,7±1,1 ^a	8,1±0,8 ^a	7,9±0,4 ^a	8,1±0,3 ^a	7,7±0,7 ^a	7,7±0,7 ^a	8,3±0,6 ^a	8,0±1,0 ^a	9,5±0,7 ^a	9,5±0,7 ^a	11,0±0,9 ^b	10,9±0,45 ^b
Temperatura (°C)	22,2±0,8 ^{bc}	22,6±1,1 ^{bc}	25,6±1,4 ^a	25,4±1 ^a	25,3±0,8 ^{ad}	25,3±1,3 ^a	23,6±1,4 ^{ac}	22,8±1,2 ^{bd}	20,4±1,6 ^{bc}	20,4±1 ^b	19,0±1 ^b	20,6±0,9 ^b

^{abcd}Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os meses (P<0,05).

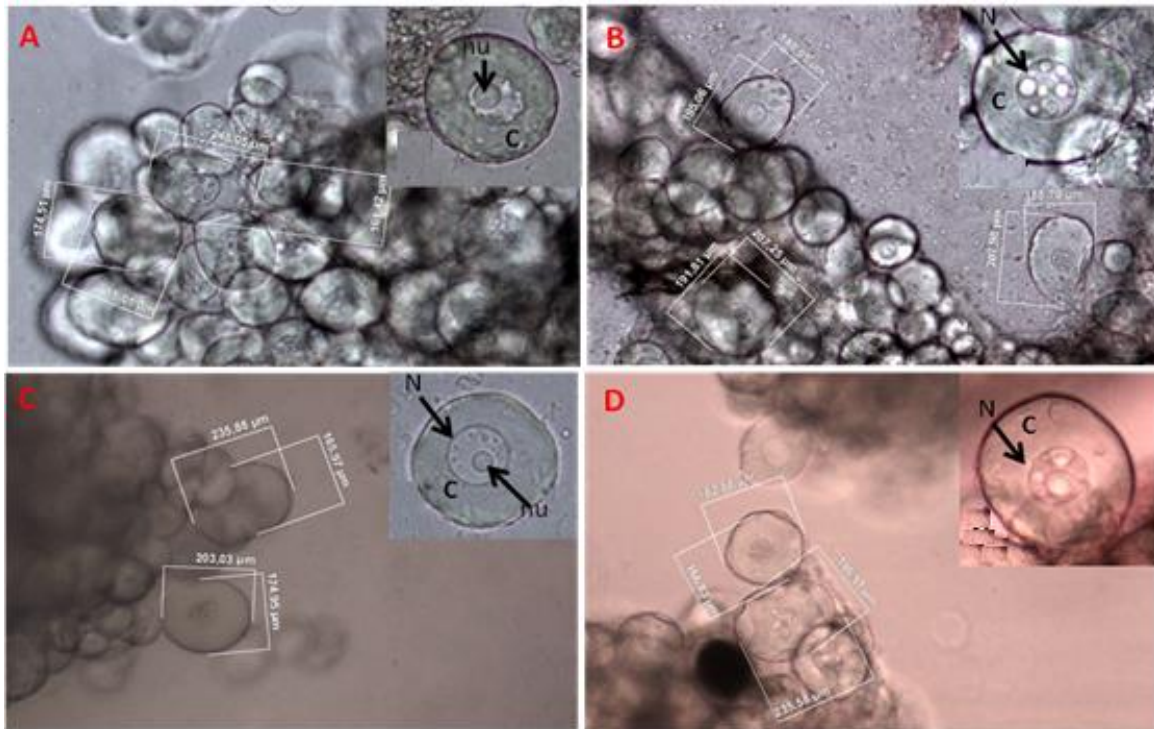


Figura 5: *Epinephelus marginatus* – Ovócitos “frescos” (*in natura*) encontrados nas estações primavera (A), verão (B), outono (C) e inverno (D). Os detalhes estão no *insert*. Mb – Membrana basal; C – Citoplasma; N – Núcleo; nu – Nucléolos.

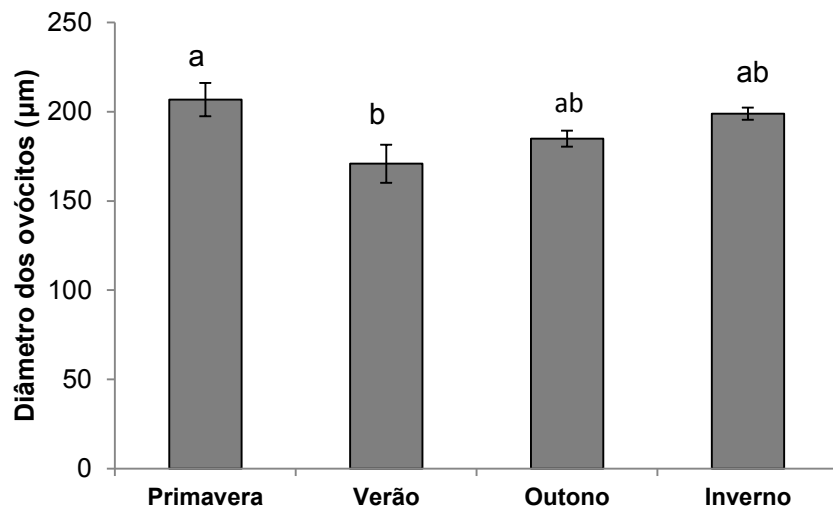


Figura 6: *Epinephelus marginatus* - Diâmetro dos ovócitos “frescos” (*in natura*) mensurados nas estações primavera, verão, outono e inverno. ^{ab} Letras diferentes indicam diferenças significativas durante as estações (P=0,021) (Média ± EPM).

4.1.2 – Análise histológica dos ovócitos

Nas análises histológicas dos ovócitos foram observadas as mesmas estruturas já identificada nos ovócitos “frescos”: citoplasma abundante, núcleo central bem desenvolvido e numerosos nucléolos (Fig. 7), estruturas estas características dos ovócitos no primeiro estágio do crescimento celular, na fase perionucleolar. Não foram encontradas diferenças nas análises histológicas entre as coletas realizadas nas diferentes estações do ano.

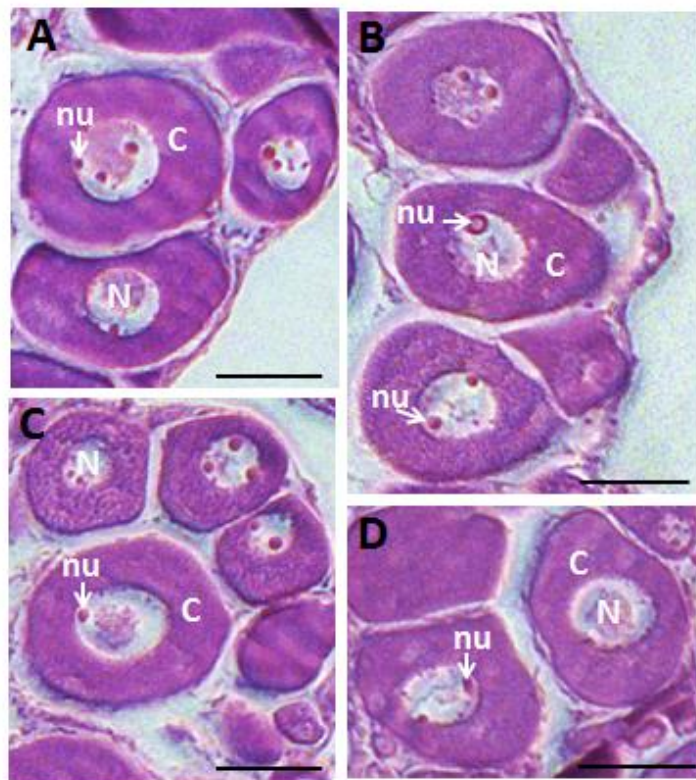


Figura 7: *Epinephelus marginatus* – Análise histológica dos ovócitos nas estações de primavera (A), verão (B), outono (C) e inverno (D) no primeiro estágio do crescimento celular. Mb – Membrana basal; C – Citoplasma; N – Núcleo; nu – Nucléolos. Barra 150 μm.

4.1.3 – Concentração plasmática dos esteroides gonadais

As concentrações de E₂ (Fig. 8) ao longo do ciclo anual apresentaram um aumento significativo em setembro, quando comparadas ao mês inicial de acompanhamento (outubro) (P= 0,017). Os andrógenos, T (Fig. 9) e 11-cetotestosterona (Fig. 10) não apresentaram variações no decorrer dos meses (P= 0,55 e P= 0,230, respectivamente). Por outro lado, a concentração plasmática de 17 α -OHP foi mais elevada no mês de novembro (primavera) e diminuíram nos meses maio e junho (outono) e julho e agosto (inverno). Adicionalmente, nos meses de outubro e janeiro, as concentrações de 17 α -OHP foram mais elevadas que nos meses de maio e junho (P \leq 0,001) (Fig. 11).

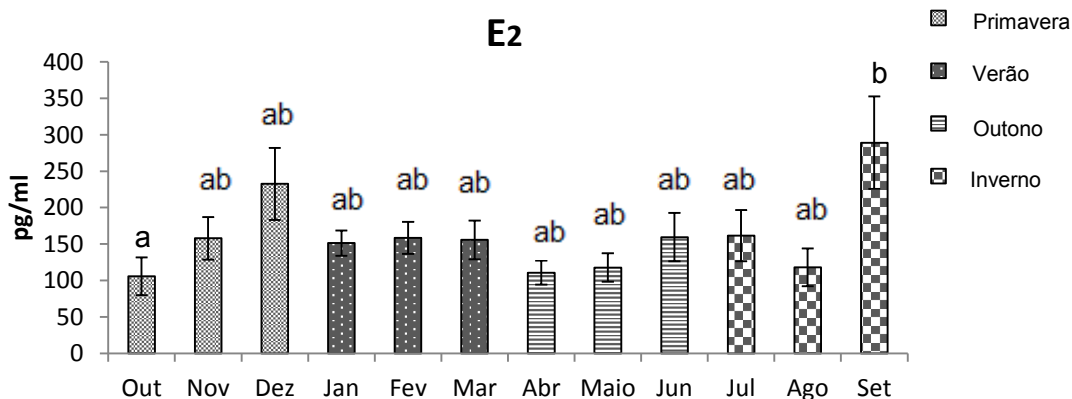


Figura 8: *Epinephelus marginatus* – Concentração plasmática de 17 β -estradiol (E₂) ao longo do ciclo anual (Média \pm EPM). ^{ab}Letras diferentes indicam diferenças significativas durante os meses (P=0.017).

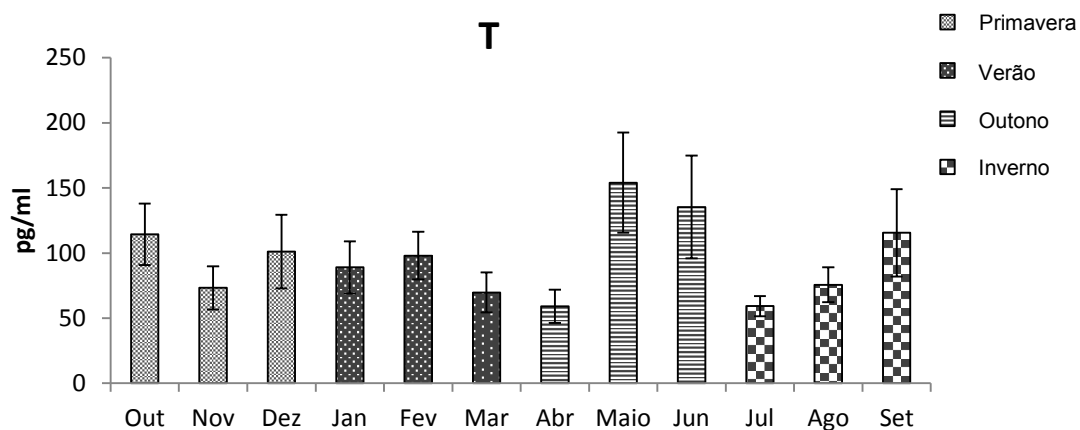


Figura 9: *Epinephelus marginatus* – Concentração plasmática de testosterona (T) ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

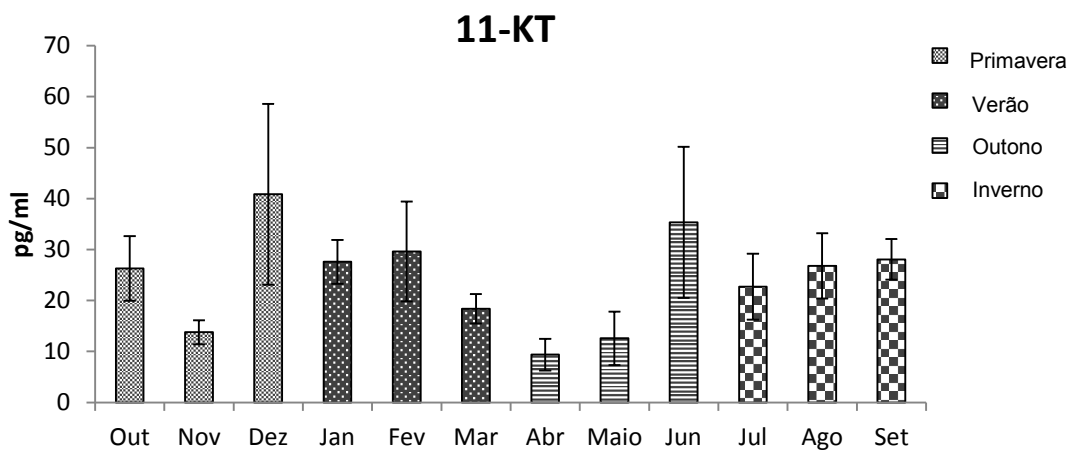


Figura 10: *Epinephelus marginatus* – Concentração plasmática de 11-cetotestosterona (11-KT) ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

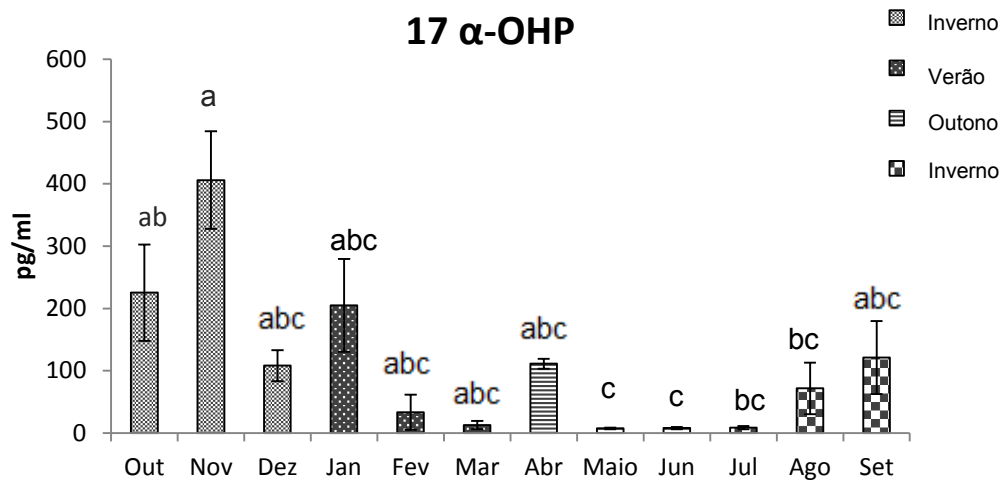


Figura 11: *Epinephelus marginatus* – Concentração plasmática de 17 α -hidroxiprogesterona (17 α OHP) ao longo do ciclo anual (Média \pm EPM).
^{abc}Letras diferentes indicam diferenças significativas durante os meses (P<0,05).

4.1.4 – Análises da gonadotropina plasmática – FSH

Análise de Similaridade do Anticorpo

As hipófises liofilizadas de animais do ambiente selvagem para a análise de similaridade com anticorpo de FSH mostrou que houve total linearidade para o anticorpo produzidos a partir da espécie do mesmo gênero, *E. coioides*, (Fig. 12).

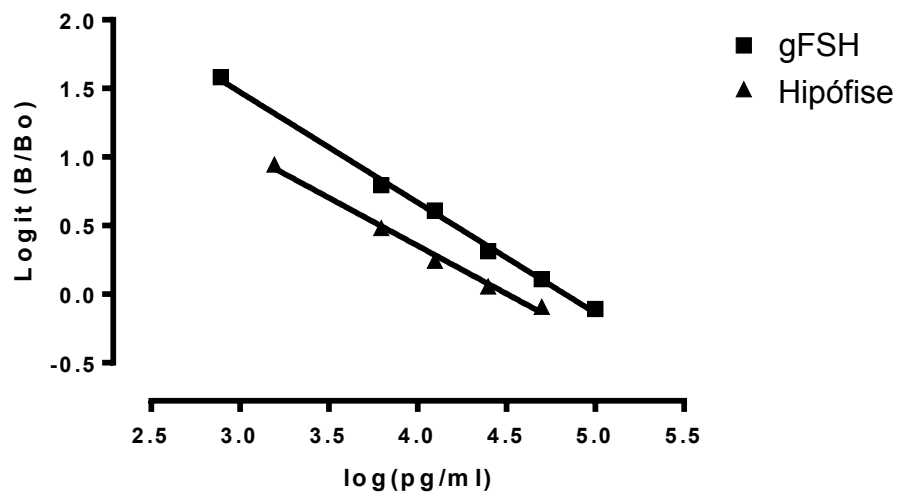


Figura 12: *Epinephelus marginatus* – Teste de linearidade do anticorpo da subunidade β de FSH (gFSH) produzidos para *E. coioides* com a hipófise de *E. marginatus*.

Elisaimunoensaio para FSH durante o ciclo anual

A análise das concentrações plasmáticas de FSH ao longo do ciclo anual demonstrou que no mês de janeiro (verão) houve um aumento significativo dos valores quando comparados aos meses abril e junho do outono e aos meses do inverno (julho, agosto, setembro) ($P \leq 0,001$) (Fig. 13).

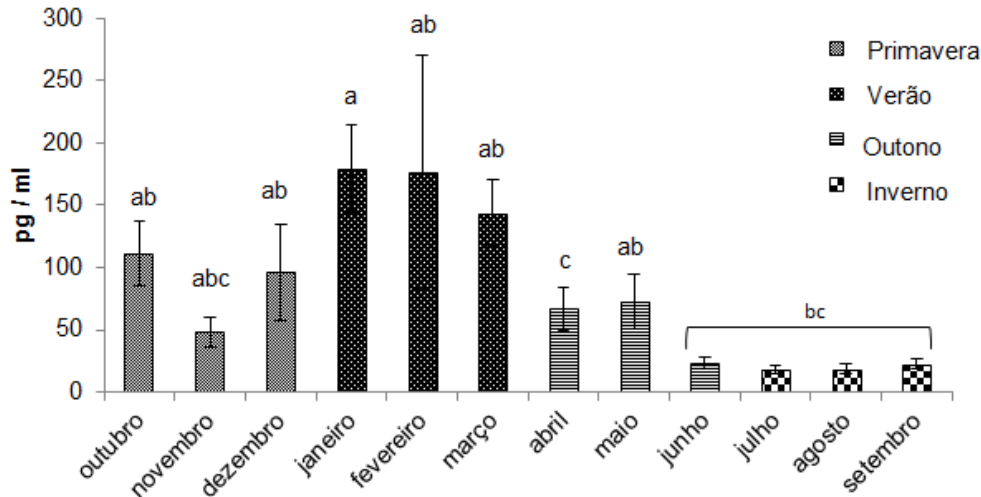


Figura 13: *Epinephelus marginatus* – Concentração plasmática de FSH ao longo do ciclo anual (Média ± EPM). ^{abc}Letras diferentes indicam diferenças significativas durante os meses ($P \leq 0,001$).

4.2 – Caracterização do perfil dos esteroides gonadais e diâmetro ovocitário em fêmeas de *E. marginatus*, em cativeiro, durante a indução hormonal

4.2.1 – Fêmeas não vitelogênicas

Diâmetro dos ovócitos

Foram observadas alterações no diâmetro ovocitário após a indução hormonal com hCG, mostrando que os ovócitos coletados após 48 e 72 horas de indução diminuíram significativamente quando comparados com aqueles coletados no momento inicial e 24 horas após a indução ($P= 0,002$) (Fig. 14). Nos animais do grupo controle não houve alteração do diâmetro após a indução hormonal ($P= 0,314$) (Fig. 15). Nas análises estereomicroscópicas dos ovócitos frescos (*in natura*), após a canulação, foi observado o citoplasma translúcido, núcleo central bem desenvolvido e numerosos nucléolos em

ambos os grupos (hCG e Controle), nos diferentes períodos amostrados (Fig. 16).

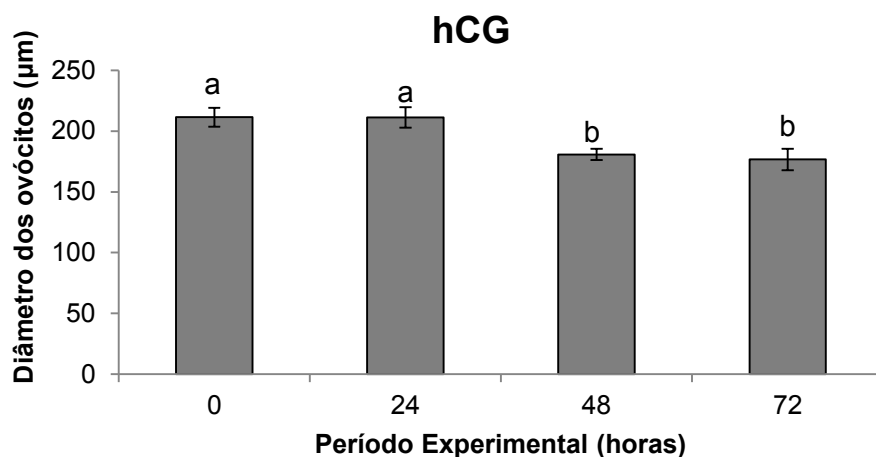


Figura 14: *Epinephelus marginatus* – Diâmetro ovocitário no início (0 horas), 24, 48 e 72 horas após a indução hormonal (hCG) (Média ± EPM). ^{ab}Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes momentos após a indução hormonal (P<0,05).

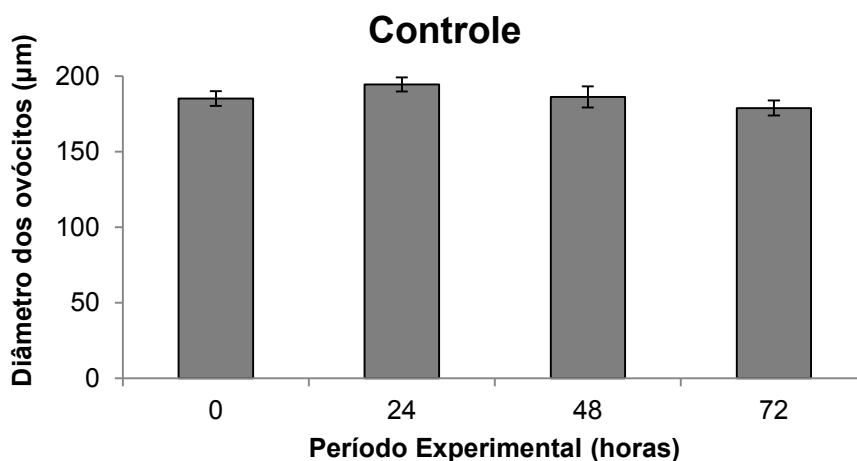


Figura 15: *Epinephelus marginatus* – Diâmetro ovocitário no início (0 horas), 24, 48 e 72 horas após a indução hormonal (controle) (Média ± EPM).

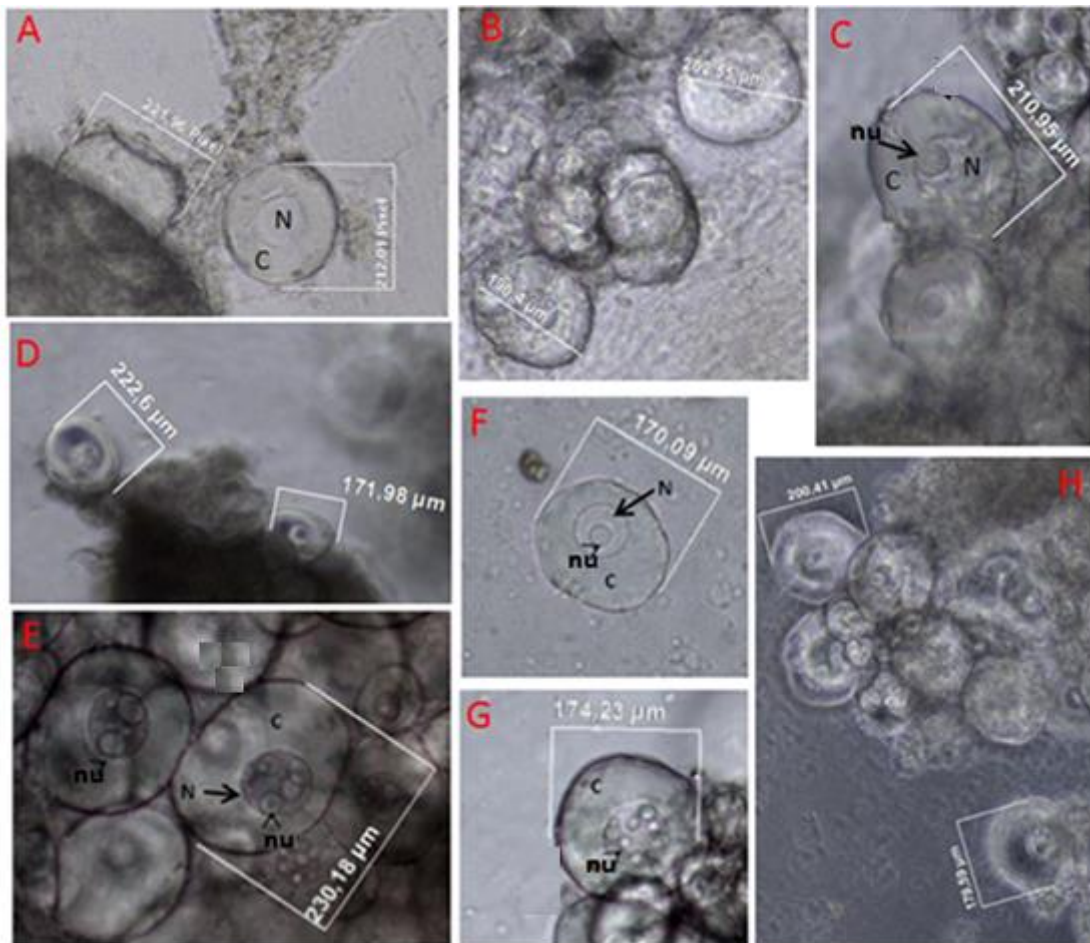


Figura 16: *Epinephelus marginatus* - Estrutura dos ovócitos “frescos” (*in natura*) do grupo hCG no período inicial, 24, 48 e 72 horas após a indução (A,B, C e D, respectivamente) e do grupo controle no período inicial, 24, 48, 72 horas após a indução (E, F, G e H, respectivamente). Mb – Membrana basal; C – Citoplasma; N – Núcleo; nu – Nucléolos.

Concentração plasmática dos esteroides gonadais

As concentrações plasmáticas de E_2 , T, 11-KT e 17α -OHP (Figs. 17, 18, 19 e 20, respectivamente) não variaram no decorrer dos períodos amostrais com 0, 24, 48 e 72 horas após indução ($P > 0,05$).

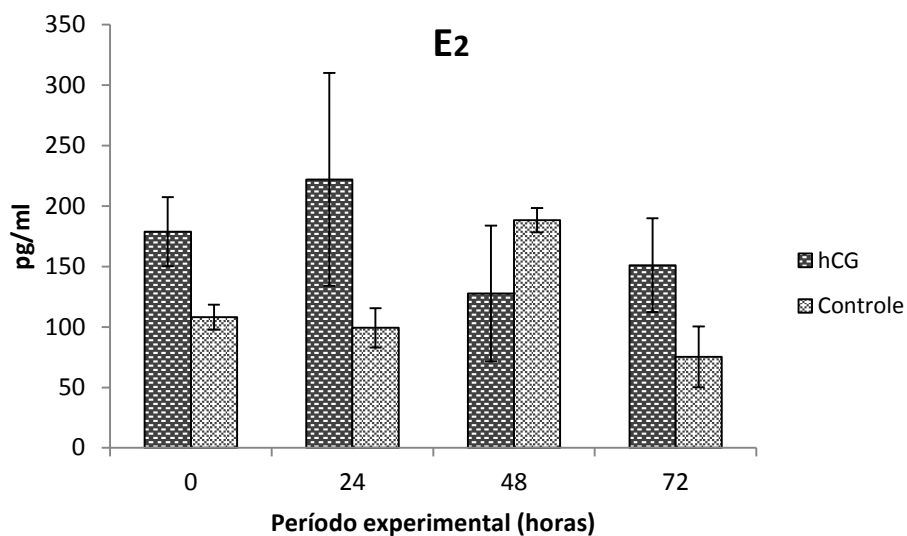


Figura 17: *Epinephelus marginatus* – Concentração plasmática de 17β-estradiol (E₂) dos animais induzidos com hCG e com soro fisiológico (Controle). As coletas sanguíneas foram realizadas no início (0 horas), 24, 48 e 72 horas após a indução (Média ± EPM).

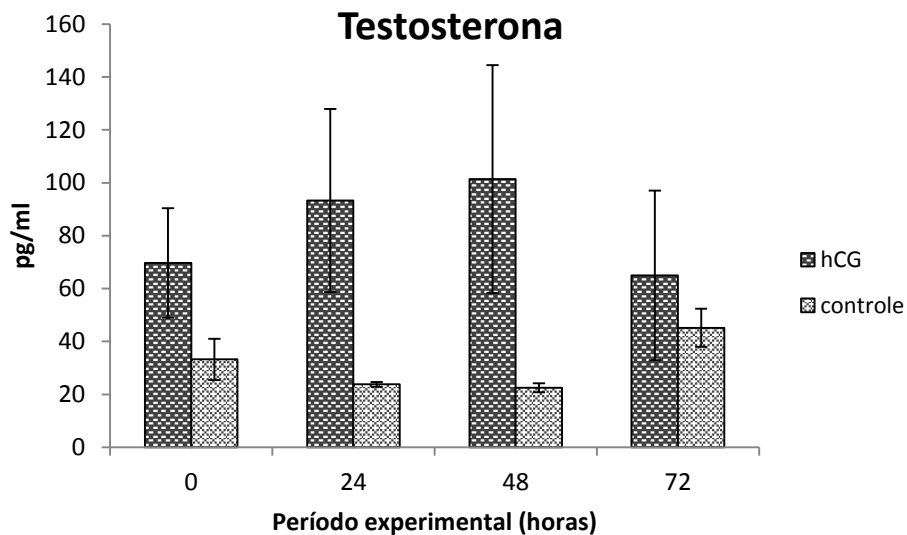


Figura 18: *Epinephelus marginatus* – Concentração plasmática de testosterona (T) dos animais induzidos com hCG e com soro fisiológico (Controle). As coletas sanguíneas foram realizadas no início (0 horas), 24, 48 e 72 horas após a indução (Média ± EPM).

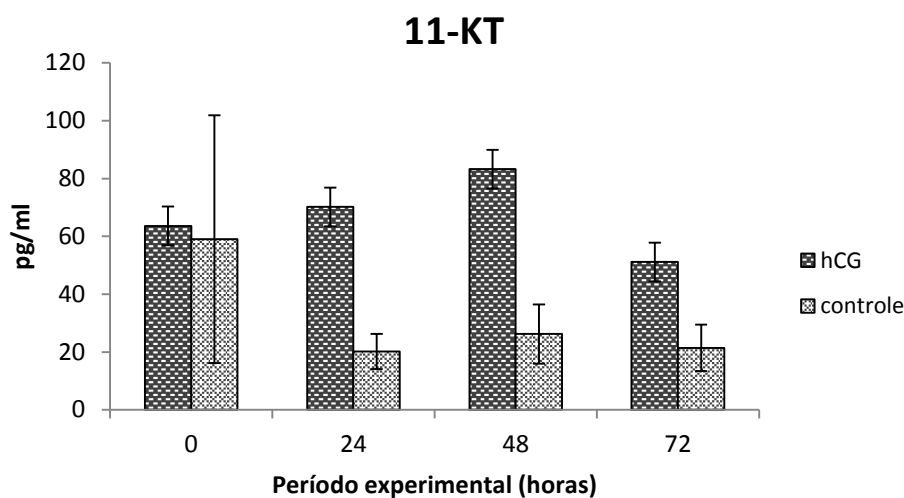


Figura 19: *Epinephelus marginatus* – Concentração plasmática de 11-cetotestosterona (11-KT) dos animais induzidos com hCG e com soro fisiológico (Controle). As coletas sanguíneas foram realizadas no início (0 horas), 24, 48 e 72 horas após a indução (Média \pm EPM).

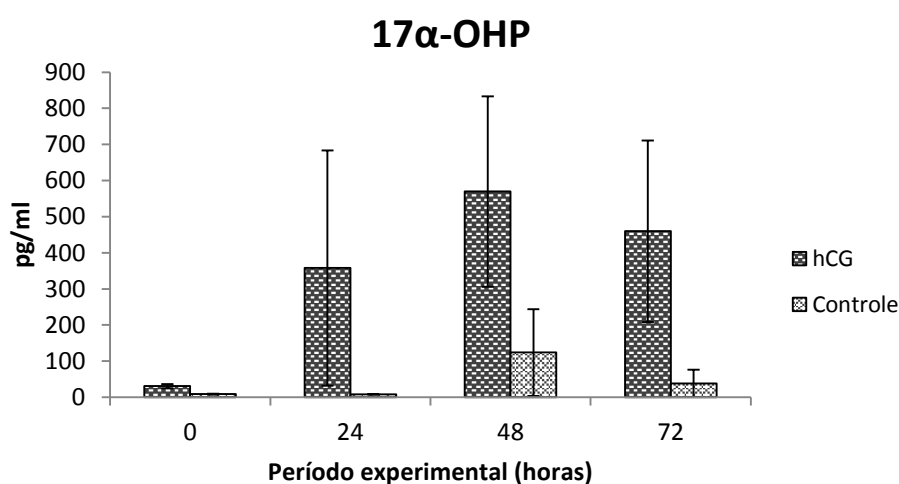


Figura 20: *Epinephelus marginatus* – Concentração plasmática de 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP) dos animais induzidos com hCG e com soro fisiológico (Controle). As coletas sanguíneas foram realizadas no início (0 horas), 24, 48 e 72 horas após a indução (Média \pm EPM).

4.2.2 – Fêmeas vitelogênicas

Os ovócitos canulados das fêmeas vitelogênicas, capturadas no ambiente natural, apresentaram o diâmetro médio de $861 \pm 52 \mu\text{m}$ (Fig. 21). Nas análises histológicas, os ovócitos canulados apresentaram o citoplasma repleto de grânulos proteicos e vacúolos lipídicos, característico de ovócitos na fase vitelogênese completa (Fig. 22).

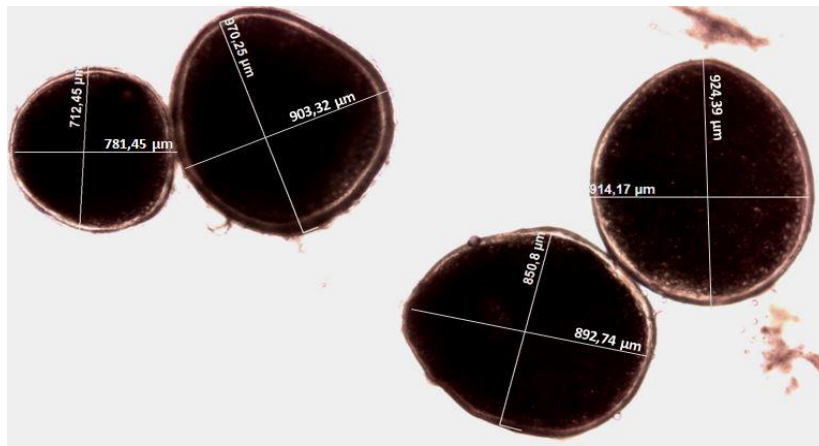


Figura 21: *Epinephelus marginatus* – Ovócitos vitelogênicos canulados das fêmeas capturadas no ambiente natural no período reprodutivo de 2013.

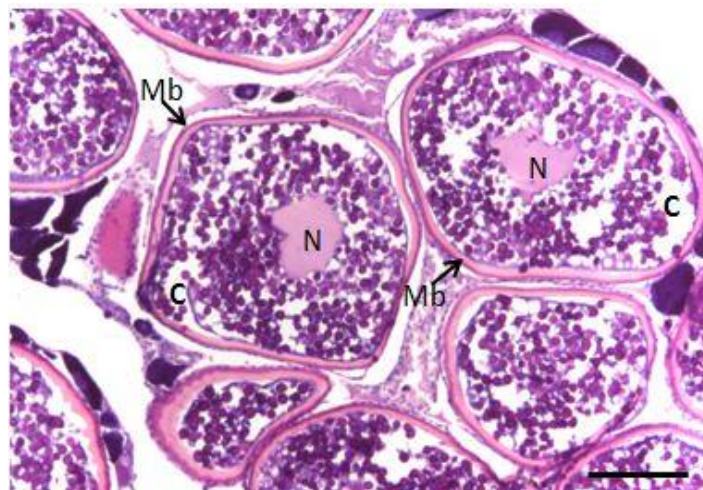


Figura 22: *Epinephelus marginatus* – Análises histológicas dos ovócitos vitelogênicos canulados das fêmeas capturadas no ambiente natural no período reprodutivo de 2013. Mb: membrana basal; N: núcleo; C: citoplasma. Barra: 300 μm.

Todas as fêmeas vitelogênicas induzidas ovularam entre o período de 24 a 32 horas após a terceira dose de hCG, resultando em dois padrões de desovas: uma desova total (60 gramas de ovo) e outra desova múltipla, em pequenos lotes (cada lote de 6 a 10 gramas). A concentração plasmática de E₂, T, 11-KT e 17 α -OHP no decorrer das doses aplicadas não apresentou diferenças significativas nos períodos amostrados (Fig. 23).

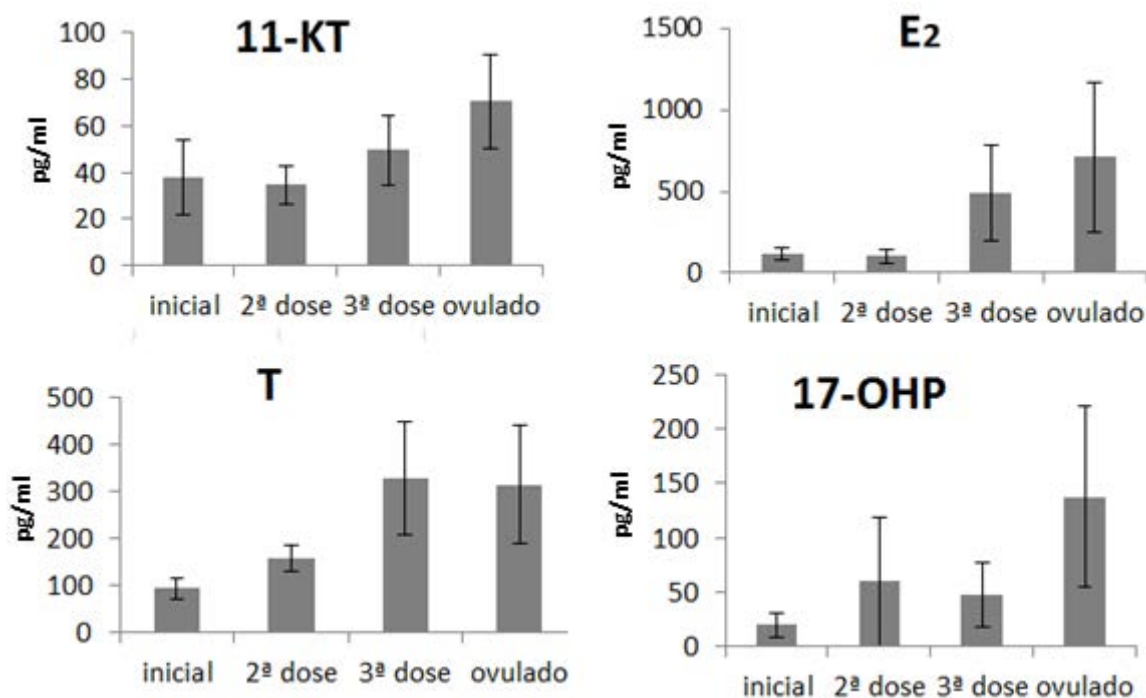


Figura 23: *Epinephelus marginatus* – Concentração plasmática de 11-cetotestosterona (11-KT), 17 β - estradiol (E₂), testosterona (T), 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP) de fêmeas vitelogênicas induzidas com hCG. As coletas sanguíneas foram realizadas no início (antes da indução), após a 2ª dose, 3ª dose e após a ovulação (Média \pm EPM).

4.3 – Experimentos de indução hormonal com implante de estradiol

A concentração plasmática de estradiol aumentou acentuadamente nos animais do grupo experimental no qual foi administrado pellet com 300µg/kg de estradiol, após os 30 dias experimentais ($P < 0,001$) quando comparado aos tempos anteriores e grupos amostrais (Fig. 24), mas não houve alteração no diâmetro ovocitário dos animais deste grupo quando comparados às fêmeas do grupo controle (Fig. 25). Houve ainda uma redução significativa do diâmetro ovocitário nas fêmeas do grupo controle (óleo de milho) na coleta de 15 e 30 dias após o início do período experimental ($P < 0,013$ e $P < 0,001$, respectivamente) e após 30 dias nos animais no grupo administrado com 150 µg/kg ($P < 0,026$) de E_2 (Fig. 25).

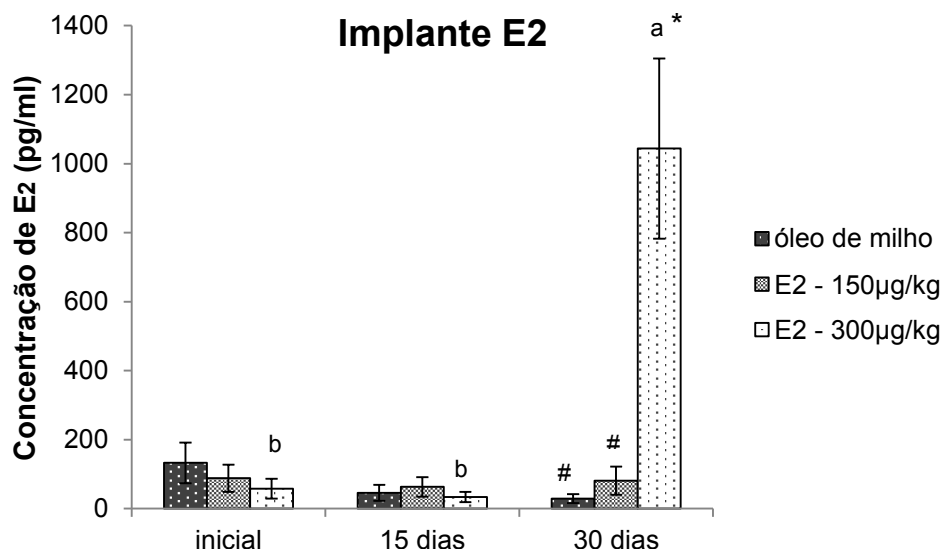


Figura 24: *Epinephelus marginatus* – Concentração plasmática de 17β- estradiol (E_2) de fêmeas adultas não vitelogênicas implantadas com pellets de estradiol. As coletas sanguíneas foram realizadas no início (antes da indução), 15 e 30 dias após a implantação (Média \pm EPM). ^{ab}Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais. [#] Símbolos diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais no mesmo tempo.

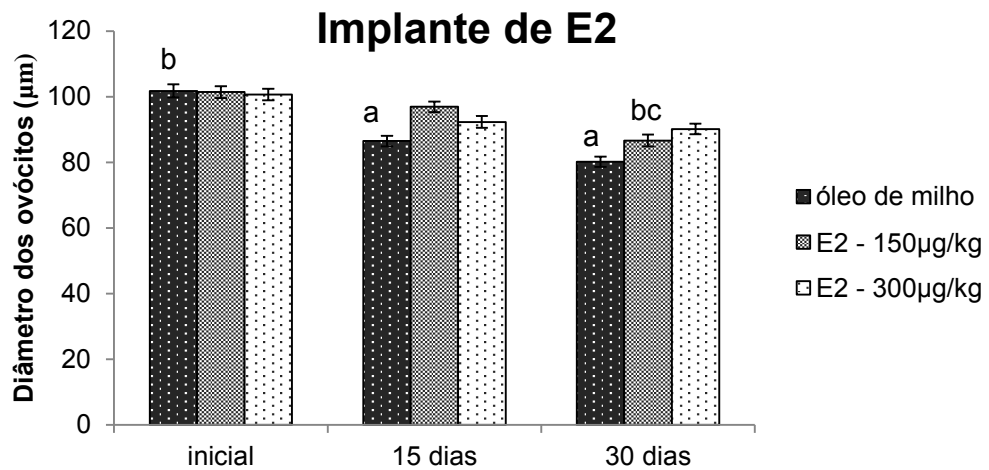


Figura 25: *Epinephelus marginatus* – Diâmetro ovocitário de fêmeas adultas não vitelogênicas implantadas com pellets de estradiol. As aferições dos diâmetros foram realizadas no início (antes da indução), 15 e 30 dias após a implantação (Média ± EPM). ^{ab}Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais.

5 – Discussão

A análise dos hormônios esteroides gonadais testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT) demonstraram que não houve nenhum padrão de variação no decorrer dos meses, nem mesmo durante a estação reprodutiva da espécie, que normalmente ocorre nos meses de primavera e verão (Andrade *et al.*, 2003; Kerber *et al.*, 2012). Com relação ao E₂, apenas no último mês do experimento de ciclo anual, (setembro) este esteroide apresentou uma elevação em relação à coleta inicial. A manutenção da concentração desses hormônios durante o período analisado pode explicar o resultado encontrado no diâmetro ovocitário, que também se manteve inalterado, ou seja, sem crescimento, durante a estação reprodutiva. Sabe-se que o E₂ é o principal esteroide produzido nas células foliculares dos ovários responsável pela síntese de vitelogenina hepática e, conseqüentemente na formação do vitelo e crescimento dos ovócitos (Lubzens *et al.*, 2010). Estes resultados corroboram a hipótese de que o perfil destes esteroides gonadais se refletiram no desenvolvimento do ovócito ao longo do ciclo anual, ou seja, níveis de estradiol inalterados por 11 meses refletiram na ausência do crescimento ovocitário. Mesmo a elevação no final do ciclo não foi suficiente para proporcionar o processo de vitelogênese.

Estes dados sugerem que, em cativeiro, fêmeas de *E. marginatus* não demonstraram sincronia sazonal na regulação da vitelogênese e maturação dos ovócitos no primeiro ano de cativeiro. A sazonalidade na reprodução dos teleósteos em ambiente natural é acompanhada pela variação na concentração dos esteroides gonadais (Fostier *et al.*, 1983). Essas variações já foram relatadas também para fêmeas de espécies do mesmo gênero aqui estudado, *E. morio* (Johnson *et al.*, 1998) e *E. akaara* (Li *et al.*, 2007) que em ambiente natural, apresentaram elevação de E₂ e T durante a estação reprodutiva, e a maturação completa dos ovócitos. Estes autores relatam que o aumento da produção de E₂ e T foi relacionado com o aumento da temperatura da água na estação reprodutiva. No presente trabalho também foi observado o aumento da temperatura da água durante a estação reprodutiva de *E. marginatus*, com aumento significativo a partir de dezembro, período no qual foi evidenciada

uma tendência de maior concentração plasmática de E₂, corroborando os dados registrados pelos autores acima citados. Um fato que dificulta qualquer tentativa de análise da influência do cativeiro no perfil anual de esteroides gonadais é a ausência de registros na literatura do perfil dos esteroides em fêmeas de *E. marginatus* em ambiente natural. Estes dados seriam fundamentais para fazer análises comparativas com essas possíveis variações hormonais e fatores abióticos, como por exemplo a temperatura da água.

Diferente dos demais esteroides, a 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP) apresentou concentrações mais elevadas no plasma das fêmeas analisadas no mês de novembro, diminuindo nos meses de maio, junho, julho e agosto, chegando até cerca de 30 vezes de redução quando comparado ao mês de concentrações mais elevadas (novembro) e mais reduzidas (junho). Pode se observar nos dois últimos meses do ciclo anual, agosto e setembro (que antecedem o período reprodutivo), o aumento deste progestágeno quando comparado aos meses anteriores. Este fato poderia sugerir uma sincronia na produção de progestágenos com o período de desova, no entanto esta interpretação é difícil de ser sustentada, considerando a ausência de vitelogênese nos ovócitos. Além disso, é importante salientar que a 17 α -OHP não é o progestágeno efetivo em peixes, mas sim precursor na via do progestágeno efetivo, 17 α -20 β -dihydroxi-4-pregnen-3-one (17 α -20 β -DHP) (ou até mesmo 17 α ,20 β ,21-trihydroxypregn-4-en-3-one já descrita em teleósteos marinhos) (Young *et al.*, 2005). Adicionalmente, 17 α -OHP é precursor da via dos corticosteroides, que são esteroides que, dependendo do contexto, podem estar envolvidos nas disfunções reprodutivas desencadeadas por situações de estresse (Milla *et al.*, 2009), como pode ser o caso da manutenção no cativeiro. Desta forma, a dosagem da concentração do hormônio cortisol no presente estudo pode dar um melhor entendimento destas vias e interpretação dos seus possíveis efeitos no cativeiro.

A 11KT não apresentou variações durante os meses analisados. No entanto, deve-se destacar que houve uma grande variação individual gerando valores elevados de erro padrão, principalmente nos meses de dezembro, fevereiro e junho, quando observa-se uma tendência de elevação da concentração plasmática de 11KT. Este andrógeno, considerado por muito tempo como fundamental apenas na espermatogênese, tem papel fundamental

no ciclo reprodutivo de fêmeas, principalmente no crescimento de ovócitos pré-vitelogênicos e na puberdade (Lokman *et al.*, 2010; Setiawan *et al.*, 2012). Os dados sugerem que o desenvolvimento ovocitário nesta fase de pré-vitelogênese parece ser bem heterogêneo em *E. marginatus*, justificado pela ampla variação de valores entre as diferentes fêmeas, no mesmo período analisado.

A concentração plasmática de FSH em *E. marginatus* evidenciaram um aumento significativo desta gonadotropina no mês de janeiro quando comparado aos meses de temperatura mais baixas (junho, julho e agosto), porém, não foi observada relação do aumento desta gonadotropina com o perfil dos hormônios esteroides sexuais analisados neste trabalho. Observando os maiores valores plasmáticos de FSH apresentados no mês de janeiro, 178 pg/ml, e comparando-os com os poucos trabalhos encontrados na literatura com medições de FSH plasmático por elisaimunoensaio, constatamos que os níveis plasmáticos de FSH encontrados ao longo do ciclo anual de *E. marginatus* são muito baixos.

Aizen *et al.*, (2007) estudando os níveis plasmáticos das gonadotropinas durante o ciclo de desovas de 12 dias em fêmeas adultas de *Oreochromis niloticus*, que é um teleósteo tropical sem um ciclo reprodutivo anual distinto, observou dois picos de liberação de FSH durante o ciclo de desova, o primeiro pico foi dois a três dias após a desova, que segundo o autor provavelmente é a fase de vitelogênese do próximo lote de desova, já o segundo pico acontece imediatamente antes da ovulação, refletindo o recrutamento de folículos para o próximo ciclo. Ambos os picos de liberação de FSH no plasma foram evidenciados os valores próximos a 60.000 pg/ml.

Em *Fundulus heteroclitus*, um pequeno teleósteo eurialino que apresenta sucessivas desovas durante o período reprodutivo, a concentração plasmática de FSH durante a temporada de desova foi de 12.000 pg/ml (Shimuzu *et al.*, 2012). Segundo os autores, os níveis elevados de FSH durante a temporada de desova de *F. heteroclitus* estão intimamente relacionados com as sucessivas desovas, resultante da produção ininterrupta e desenvolvimento dos gametas em ambos os sexos.

Já os níveis plasmáticos de FSH para um perciforme marinho, o *Dicentrarchus labrax*, com estratégia reprodutiva similar a de *E. marginatus*,

desenvolvimento ovariano com múltiplos lotes, são evidenciados com picos plasmáticos durante a vitelogênese inicial de 35.000 pg/ml e seus limites basais de 15.000 pg/ml são encontrados durante a ovulação (Molés *et al.*, 2012). Em estudos anteriores, Molés *et al.* (2011) evidenciaram níveis máximos de E2 plasmáticos durante a vitelogênese de *D. Labrax*, coincidindo com os níveis máximos encontrados para FSH.

Vários estudos têm demonstrado que o FSH estimula a produção *in vitro* de E2 em folículos ovarianos isolados (Suzuki *et al.*, 1988; Planas *et al.*, 2000; Montserrat *et al.*, 2004; Móles *et al.*, 2008, 2011). Em salmão prateado, Swanson (1991) relatou que a concentração de FSH plasmático aumentou durante vitelogênese, com os mais altos níveis durante a vitelogênese. Outros trabalhos indicaram também que o FSH é responsável por outros eventos, tais como a diferenciação do sexo (Shimizu *et al.*, 2008) e mudanças de sexo (Kobayashi *et al.*, 2010).

A ausência da maturação do ovócito, vitelogênese, ovulação e desova em peixes cultivados normalmente ocorrem devido à ausência dos estímulos ambientais apropriados e presença de agentes estressores do cativeiro (Schreck *et al.*, 2001). Por exemplo, muitos dos peixes cultivados, de importância comercial migram milhares de quilômetros para atingir nichos ambientais com condições ótimas para sobrevivência de sua prole. Durante esta migração ou com a chegada aos locais de desova, os peixes podem vivenciar mudanças ambientais importantes, ex.: salinidade ou substâncias químicas na água, temperatura, profundidade ou característica do substrato. A manutenção dos peixes em tanques em combinação com estímulos artificiais (ex. sons provenientes de equipamentos e presença de seres humanos) podem trazer efeitos negativos na função reprodutiva dos peixes (Zohar, 1989), o que parece ocorrer com *E.marginatus* em cativeiro.

No experimento de indução hormonal no qual hCG foi administrado nas fêmeas não vitelogênicas nenhum dos hormônios analisados apresentou alteração significativa no plasma ao longo do período experimental. Porém, existe uma clara tendência de aumento dos andrógenos e da 17 α -OHP em relação aos animais do grupo controle a partir de 24h da administração desta GtH. Considerando o diâmetro dos ovócitos que diminuiram na coleta de 48 e 72 horas após a indução com hCG, sugerimos que esta diminuição possa ser

decorrente de deficiência metodológica, como o reduzido número de diâmetros registrados. É evidente que não podemos rejeitar a hipótese da ação do hCG nesta redução, haja vista que este fato não ocorreu no grupo controle, mas consideramos a etapa experimental ainda limitada para estas especulações. Desta forma, nossa hipótese de que a indução hormonal resultaria em variações dos esteroides sexuais, e conseqüentemente, desenvolvimento dos ovócitos deve ser melhor investigada em estudos mais detalhados com base nas doses e tempo.

No experimento de indução hormonal com fêmeas vitelogênicas podemos sugerir que nossa hipótese foi validada, pois as análises de esteroides gonadais no plasma demonstraram elevações suficientes para ocorrer a ovulação em *E. marginatus*, porém essas elevações não foram constatadas estatisticamente. Sugerimos que o número reduzido de fêmeas amostradas e/ou a presença de dois padrões de desova possa ter refletido nos desvios padrões altos. É importante destacar que, considerando-se o estatus de conservação de *E. marginatus*, é inviável a realização de experimentos com número elevado de indivíduos, o que em alguns momentos dificulta as análises estatísticas. É válido mencionar que o padrão de múltiplas desovas em lotes é relatado por Marino *et al.* (2003) na mesma espécie, porém a presença desse padrão de desova constatado em duas fêmeas amostradas e a necessidade de aplicação da terceira dose de hCG nas três fêmeas amostradas não havia sido realizado e evidenciado nas práticas de indução realizadas pela equipe do Projeto Garoupa (Auxílio Regular FAPESP, 2011/50407-4) em induções anteriores. Desta forma, podemos associar este acontecimento ao estresse durante as coletas sanguíneas e/ou a retirada de plasma continuamente ao longo da prática de indução.

O experimento com implantes de pellets de estradiol mostrou-se efetivo na liberação do estradiol na corrente sanguínea de *E. marginatus*, porém não foi possível estimular o crescimento das células germinativas, refutando assim nossa hipótese. Estudos recentes com implantes de E₂ em fêmeas de esturjão (*Huso huso*) previtelogênicas induziu a produção da vitelogenina, aumentando os níveis de cálcio, colesterol e fósforo, mas não resultou no avanço dos estágios da ovogênese (Akhavan *et al.* 2015).

O estradiol é conhecido como um forte indutor da síntese da vitelogenina hepática, aumentando consideravelmente os níveis de vitelogenina no soro de vertebrados ovíparos (Specker and Sullivan, 1994). Segundo Lubzens *et al.* (2010) a surgimento de ovócitos cortical alveolar (pré-vitelogenicos) é associada com o aumento do FSH na hipófise e no plasma, de estradiol no plasma e da expressão de genes que codificam a proteína StAR (Steroidogenic Acute regulatory), que auxilia na travessia da molécula de colesterol através da membrana mitocondrial interna, o passo limitante para esteroidogênese gonadal. O início da vitelogênese é caracterizado pelo aumento de FSH e estradiol no plasma, e aumento da expressão do receptor de FSH no ovário (Swanson *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2008). Desta forma, um entendimento mais completo dos mecanismos de ação a partir de como o estradiol afeta a fisiologia reprodutiva de *E. marginatus* é desejável. Considerando-se que neste experimento houve aumento da concentração de E₂ plasmática, mas que não resultou em vitelogênese, especula-se que algumas etapas do controle fisiológico da vitelogênese possam ter falhado, como por exemplo, disponibilidade de reservas energéticas para a síntese de vitelogenina, presença ou atividade de receptores de E₂, ou até mesmo, deficiências no complexo processo de endocitose da vitelogenina e seus receptores, modulado pelo FSH, que pode estar reduzido devido ao *feedback* negativo promovido pelo E₂ na síntese de FSH (Lubzens *et al.*, 2010).

A manipulação do controle endócrino em níveis mais elevados (hipotálamo e hipófise) pode ser testado em *E. marginatus* para induzir a vitelogênese através, por exemplo, de implantes de liberação lenta em combinações com análogos de GnRH e esteroides gonadais atuando mas efetivamente no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

Retomando a classificação das disfunções reprodutivas já apresentadas por Zohar & Mylonas (2001) poderíamos classificar *E. marginatus* como uma espécie que apresenta disfunções do primeiro tipo, semelhante às enguias, quando a vitelogênese falha completamente em cativeiro. No entanto, Kerber *et al.*, (2012) após três anos de manutenção de fêmeas desta mesma espécie no cativeiro (na mesma região do litoral norte do estado de São Paulo), obteve sucesso na reprodução induzida (LHRHa) com animais com diâmetro ovocitário acima de 325µm. Porém, antes de três anos, este processo não havia sido

possível (Kerber, com. pessoal), mostrando que a vitelogênese em cativeiro nesta espécie é possível, mas o processo de aclimação pode ser demorado e depende das condições de cultivo, que no caso dos referidos autores foi obtido em tanques com volume e profundidade superiores, e densidade de estocagem inferior àquela do presente trabalho.

Considerando a abordagem do parágrafo anterior sobre a aclimação desses animais ao cativeiro e analisando o valor absoluto da concentração de E₂ no ciclo anual, com os valores obtidos por Garcia *et al.*, (2013), com fêmeas da mesma espécie, recém chegados ao cativeiro (cerca de 20 dias), coletadas no mesmo local, podemos sugerir que os animais estão avançando no processo de aclimação. Essa afirmação tem como base o fato de que os andrógenos (T e 11KT) estão reduzidos nos animais do presente trabalho em cerca de 5 a 10 vezes no caso da T (meses da primavera e verão, respectivamente) em relação aos animais analisados por Garcia *et al.*, (2013) e a concentração de 11KT, cerca de 2 a 3 vezes inferior. As concentrações de T para espécies do mesmo gênero coletadas em ambiente natural também são mais elevadas (Johnson *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2007). Por outro lado, a concentração plasmática de E₂ que no presente trabalho apresentou uma variação de 100 a 300 pg/ml, e manteve-se por volta de 30-70 pg/ml nas fêmeas recém-coletadas por Garcia *et al.*, (2013). Desta forma: 1) concentrações mais elevadas de estrógenos nos animais mantidos já há 9 meses, associadas com as elevações já discutidas; 2) concentrações reduzidas de andrógenos em relação aos dados da literatura de fêmeas recém coletadas, da mesma espécie, no mesmo local; e 3) o fato descrito na literatura (Kerber *et al.*, 2012) de que fêmeas adultas de *E. marginatus* podem levar algum tempo para atingir a fase vitelogênica em cativeiro; nos levam a sugerir que este processo de aclimação e sincronização dos animais ao ciclo reprodutivo foi iniciado nos animais do presente experimento ao longo do primeiro ano no cativeiro.

As razões que levam às disfunções endócrinas na maturação dos ovócitos vêm sendo identificada pela atuação do LH durante a vitelogênese. Estudos em *Morone saxatilis* demonstraram que o LH foi sintetizado e armazenado na hipófise durante a vitelogênese em animais selvagens, uma vez que o nível plasmático de LH e seu RNAm na hipófise não diferiram entre

as fêmeas selvagens e em cativeiro, evidenciando que o problema nesta espécie é de falta de liberação desta gonadotropina e não a síntese em cativeiro (Mylonas *et al.*, 2010). Além disso, os níveis de RNAm do receptor de GnRH na hipófise de *M. saxatilis* foram semelhantes entre as fêmeas selvagens e no cativeiro, sugerindo que a liberação de LH em cativeiro não é uma disfunção devida a capacidade de resposta da hipófise, e sim por uma função encefálica. Nesta mesma espécie as análises de expressão de GnRH mostraram que os níveis de expressão de RNAm são semelhantes no encéfalo de fêmeas selvagens e de cativeiro durante a maturação ovocitária. No entanto, a quantidade de GnRH que atinge a hipófise dos animais em cativeiro é inferior, evidenciando uma disfunção no processo de liberação deste neuro-hormônio (Steven, 2000).

Antes mesmo do real entendimento das disfunções endócrinas, há décadas, diversas técnicas de terapias hormonais vêm sendo testadas em peixes, como exemplos, purificações de LH a partir da hipófise de peixes maduros (Lam, 1982), utilização de hCG (Ohta & Tanaka, 1997; Zohar & Mylonas, 2001), injeções de análogos de GnRH (GnRH_a) com ou sem antagonistas de dopamina (Yaron, 1995; Kaminsh *et al.*, 2004), sistemas de liberação de GnRH_a de forma lenta usando *pellets* de colesterol ou de substâncias sintéticas (Mylonas & Zohar, 2001b), e injeções de microesferas biodegradáveis de GnRH_a (Mylonas & Zohar, 2001a; Barbaro *et al.*, 2002).

Nos últimos anos o uso de bombas osmóticas, que permitem a administração contínua de proteínas e peptídeos, vem sendo utilizadas em peixes para administração de preparações hormonais por períodos prolongados (McQuillan *et al.*, 2011; Lim & Sorensen, 2012). Este sistema também tem sido utilizado com GnRH e hCG para indução da maturação em machos de enguias (Kasuga *et al.*, 2008; Kagawa *et al.*, 2009). Mais recentemente, Kanemaru *et al.*, (2012) induziram a maturação sexual de fêmeas da garoupa asiática *Epinephelus merra* no período não reprodutivo, modulando fatores ambientais, utilizando também este sistema de liberação controlada, as bombas osmóticas com GnRH. Desta forma, estudos posteriores que visam aplicar este mecanismo de indução hormonal contínua para estimular a maturação gonadal de *E. marginatus* em cativeiro são de grande valia para o avanço e sucesso no manejo reprodutivo desta espécie no Brasil.

6 - Conclusões

O perfil dos esteroides gonadais durante o ciclo anual justifica a ausência de ovócitos pré-vitelogênicos, enfatizamos que este estágio de desenvolvimento do ovócito é crucial para o sucesso nas técnicas de terapia hormonal que induz a ovulação e desova. Podemos sugerir que os baixos valores absolutos de FSH no plasma da garoupa, *E. marginatus*, é uma das explicações para a ausência do início da vitelogênese em cativeiro.

No experimento de indução com hCG em fêmeas não vitelogênicas apenas a concentração plasmática de 17α -OHP aumentou após a estimulação com doses de hCG, porém, este aumento não foi refletido no diâmetro do ovócito, pois não houve estímulo da vitelogênese.

No experimento com fêmeas vitelogênicas os níveis plasmáticos dos esteroides gonadais apresentaram um aumento progressivo após a indução hormonal e as três fêmeas ovularam entre 24 a 32 horas após a terceira dose de hCG, apresentando dois padrões distintos de desova: desova completa ou desova em pequenos lotes. As investigações parciais desse estudo evidenciaram que o uso de hCG em *E. marginatus* foi efetivo, entretanto, doses e tempos de ovulação devem ser investigados.

O uso de implantes de estradiol na cavidade abdominal de *E. marginatus* pode-se ser considerado funcional, visto que foi constatado um aumento do estradiol plasmático no grupo experimental, porém, falhas em outros processos metabólicos e/ou endócrinos inviabilizaram a ação do estradiol em promover a vitelogênese.

Por fim, consideramos que o uso de hCG é viável para induzir a maturação final e ovulação em fêmeas vitelogênicas e sugerimos um período aproximado de 3 anos de aclimatação dos animais mantidos em condições de cativeiro para que possa ocorrer o início da vitelogênese.

7 – Referências Bibliográficas

- AIZEN, J.; KASUTO, H., LEVAVI-SIVAN, B. Development of specific enzyme-linked immunosorbent assay for determining lh and fsh levels in tilapia, using recombinant gonadotropins. *General and Comparative Endocrinology*, 153: 323–332. 2007.
- AKHAVAN, S.R., FALAHATKAR, B., MOHAMMAD, H., GILANI, T., LOKMAN, P. M. Effects of estradiol-17 implantation on ovarian growth, sex steroid levels and vitellogenin proxies in previtellogenic sturgeon *Huso huso*. *Animal Reproduction Science*, 157: 1-10. 2015.
- ANDRADE, A. B., MACHADO, L. F., HOSTIM-SILVA, M., BARREIROS, J. P. Reproductive Biology of the dusky Grouper *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46: 373-382, 2003.
- BARBARO, A., FRANCESON, A., BERTOTTO, D., BOZZATO, G., DI MARIA, I., PATARNELLO, P., FURLAN, F., COLOMBO, L. More effective induction of spawning with long-acting GnRH agonist in the shi drum, *Umbrina cirrosa* L. (Sciaenidae, Teleostei), a valuable candidate for Mediterranean mariculture. *Journal Applied Ichthyology*, 18, 192–199. 2002.
- BARREIROS, J.P. Sexual inversion in *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces: Serranidae, Epinephelinae) nos Açores. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 5: 81-90. 1998.
- BHANDARI, R.K., KOMURO, H., MIKIHICO, H. MASSARU, N. Sex inversion of sexually immature honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by aromatase inhibitor. *Zoological Science*, 21: 305-310. 2004.
- BLÁZQUEZ, M. & SOMOZA, G. M. Fish with thermolabile sex determination (TSD) as model to study brain sex differentiation. *General and Comparative Endocrinology*, 166: 470-477. 2010.
- CHEN, J., ZHANG, Y., TANG, Z., MAO, J., KUANG, Z., QIN, C., LI, W. Production of recombinant orange-spotted grouper (*Epinephelus*

coioides) follicle-stimulating hormone (FSH) in single-chain form and dimer form by *Pichia pastoris* and their biological activities. *General and Comparative Endocrinology*, 178: 237–249. 2012.

DONALDSON, E.M. Reproductive endocrinology of fishes. *American Zoologist*, 13, 909–927. 1973.

DUFOUR, S., WELTZIEN, F. A., SEBERT, M. E., BELLE, N. L., VIDAL, B., VERNIER, P., PASQUALINI, C. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes. Ecophysiological and evolutionary implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1040, 9-21. 2005.

FOSTIER, A., JALABERT, B., BILLARD, R., BRETON, B. & ZOHAR, Y. The gonadal steroids. In *Fish Physiology* (Hoar, W. S. & Randall, D. J., eds), pp. 277–372. New York: Academic Press. Fostier, A., Jalabert, B., Billard, R., Breton, B. & Zohar, Y. 1983.

GARCIA, C. E. O., ARAÚJO, B. C., MELLO, P. H., NARCIZO, A. M., RODRIGUES-FILHO, J. A., MEDRADO, A. T., ZAMPIERI, R. A., FLOETER-WINTER, L. M., Moreira, R. G. Involvement of pituitary gonadotropins, gonadal steroids and breeding season in sex change of protogynous dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), induced by a non-steroidal aromatase inhibitor. *General and Comparative Endocrinology*, 192: 170-180. 2013.

GRIER, H. J., URIBE. M.C., PATIÑO, R. The ovary, folliculogenesis and oogenesis in teleosts. In Jamieson, B.J.M (Ed): *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa*, 802, 2009.

IUCN. Red List of Threatened Species. Version 2015.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 27 August 2009.

JIANG, J. Q., WANG, D.S., SENTHILKUMARAN, B., KOBAYASHI, T., KOBAYASHI, H. K., YAMAGUCHI, A., GE, W., YOUNG, G., NAGAHAMA,

- Y. Isolation, characterization and expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 cDNAs from the testes of Japanese eel (*Anguilla japonica*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Molecular Endocrinology*, 31: 305-315. 2003.
- JOHNSON, K., THOMAS, P., WILSON-JR, R.R. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. *Journal of Fish Biology*, 52: 502–518. 1998.
- KAGAWA, H., KASUGA, Y., ADACHI, J., NISHI, A., HASHIMOTO, H., IMAIZUMI, H., KAJI, S. Effects of continuous administration of human chorionic gonadotropin, salmon pituitary extract, and gonadotropin-releasing hormone using osmotic pumps on induction of sexual maturation in male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 296: 117-122. 2009.
- KAMINSKI, R., KUSZNIERZ, J., MYSZKOWSKI, L., WOLNICKI, J. The first attempt to artificially reproduce the endangered cyprinid lake minnow *Eupallasella perenurus* (Pallas). *Aquaculture International*, 12: 3–10. 2004.
- KANEMARU, T., NAKAMURA, M., MURATA, R., KUROKI, K., HORIE, H., UCHIDA, K., SENTHILKUMARAN, B., KAGAWA, H. Induction of sexual maturation of the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, in the non-breeding season by modulating environmental factors with GnRH analogue implantation. *Aquaculture*, 358: 85-91. 2012.
- KASUGA, Y., ADACHI, J., NISHI, A., HASHIMOTO, H., KAJI, S., HORIUCHI, Y. Induction of sexual maturation of male Japanese eel (*Anguilla japonica*) by continuous administration of various hormones using osmotic pump. *Cybium*, 32: 171. 2008.
- KERBER, C.E., SILVA, H. K. A., SANTOS, P. A., SANCHES, E. G. Reproduction and Larviculture of Dusky Grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) in Brazil. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2: 229-234. 2012.
- KOBAYASHI, T., PAKARINEN, P., TORGERSEN, J., HUHTANIEMI, I., ANDERSEN, O. The gonadotropin receptors FSH-R and LH-R of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Differential follicle expression and

- asynchronous oogenesis. *General and Comparative Endocrinology*, 156, 595–602. 2008.
- KOBAYASHI, Y., ALAM, M. A., HORIGUCHI, R., SHIMIZU, A., NAKAMURA, M. Sexually dimorphic expression of gonadotropin subunits in the pituitary of protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*): evidence that folliclestimulating hormone (FSH) induces gonadal sex change. *Biology of Reproduction*, 82: 1030–1036. 2010.
- LAM, T.J. Applications of endocrinology to fish culture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39, 11–137. 1982.
- LEVAVI-SIVAN, B., SAFARIAN, H., ROSENFELD, H., ELIZUR, A., AVITAN, A. Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene expression in tilapia: effect of GnRH and dopamine. *Biology of Reproduction*. 70: 1545–1551. 2004.
- LEVAVI-SIVAN, B., BOGERD, J., MAÑANÓS, E. L., GÓMEZ, A. & LAREYRE, J. J. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 412-437. 2010
- LI, G.L., LIU, X. C., LIN, H. R. Seasonal changes of serum sex steroids concentration and aromatase activity of gonad and brain in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Animal Reproduction Science*, 99 156–166 2007.
- LI, C., ZHOU, L. WANG, Y., HONG, Y., GUI, J. Molecular and expression characterization of three gonadotropin subunits common, FSH and LH in groupers. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 233: 33–46, 2005.
- LIM, H., SORENSEN, P.W. Common Carp Implanted with Prostaglandin F₂-alpha Release a Sex Pheromone Complex that Attracts Conspecific Males in Both the Laboratory and Field. *Journal Chemical Ecology*, 38:127-134. 2012.
- LOKMAN, P.M., KAZETO, Y., OZAKI, Y., IJIRI, S., TOSAKA, R., KOHARA, DIVERS, M., MATSUBARA, H., MOORE, L.G., ADACHI, S. Effects of reproductive stage, GH, and 11-ketotestosterone on expression of growth

- differentiation factor-9 in the ovary of the eel, *Anguilla australis*. *Reproduction* 139: 71–83. 2010.
- LUBZENS, E. YOUNG, G., BOBE, J., CERDÀ, C.J. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 367–89. 2010.
- LUDWIG, M., FELBERBAUM, R.E., DIEDRICH, K., LUNEFELD, B. Ovarian stimulation: from basic science to clinical application. *Reproductive Biomedicine*, 5: 73–86. 2002.
- LUVIZUTO, E. R., OKAMOTO, T., OKAMOTO, R., QUEIROZ, T. P., DORNELLES, R. C. M., DIAS, S. M. D., GARCIA JR, I. R. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Archives of Oral Biology*, 55: 52–59. 2010.
- MARINO, G., PANINI, E., LONGOBARDI, A., MANDICH, A., FINOIA, M.G., ZOHAR, Y., MYLONAS, C.C. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture*, 219: 841–858. 2003.
- MCQUILLAN, H.J., KUSAKABE, M., YOUNG, G. Effects of chronic manipulation of adrenocorticotrophic hormone levels in Chinook salmon on expression of interrenal steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes. *General and Comparative Endocrinology*, 174: 156–165. 2011.
- MIGATA, M., MATSUMOTO, J., KINOSHITA, H., SASAKI, A., ASHIKAWA, I. Studies on the hypophyseal hormone of fish. I. stimulating effect upon ovulation of trout. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*. 17: 25–31. 1952.
- MILLA, S., WANG, N., MANDIKI, S.N.M., KESTEMON, P. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 153: 242–25. 2009.
- MOLÉS, G., GÓMEZ, A., ROCHA, A., CARRILO, M., ZANUY, S. Purification and characterization of follicles-stimulating hormone from pituitary glands

- of sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *General and Comparative Endocrinology*, 158: 68–76. 2008.
- MOLÉS, G., ZANUY, G., MUÑOZ, I., CRESPO, B., MARTÍNEZ, I., MAÑANÓS, E., GÓMEZ, A. Receptor specificity and functional comparison of recombinant sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonadotropins (Fsh and Lh) produced in different host systems. *Biology of Reproduction*, 84: 1171–1181. 2011.
- MOLÉS, G., GÓMEZ, A., CARRILLO, M., ZANUY, S. Development of a homologous enzyme-linked immunosorbent assay for European sea bass FSH. Reproductive cycle plasma levels in both sexes and in yearling precocious and non-precocious males. *General Comparative Endocrinology*, 176: 70-78. 2012.
- MONTSERRAT, N., GONZÁLEZ, A., MENDEZ, E., PIFERRER, F., PLANAS, J. V. Effects of follicle stimulating hormone on estradiol-17 beta production and P-450 aromatase (CYP19) activity and mRNA expression in brown trout vitellogenic ovarian follicles in vitro. *General Comparative Endocrinology*, 137: 123–131. 2004.
- MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A. & ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General Comparative Endocrinology*, 165: 516-534. 2010.
- MYLONAS, C.C., ZOHAR, Y. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. In: Babin, P.J., Cerdá, J., Lubzens, E. (Eds.), *The Fish Oocyte: from Basic Studies to Biotechnological Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 433–470. 2007.
- MYLONAS, C.C., ZOHAR, Y.. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. *Aquaculture*, 202: 205–220. 2001a
- MYLONAS, C.C., ZOHAR, Y. Use of GnRH α -delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10, 463–491. 2001b.

- OHTA, H., TANAKA, H. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 153: 123–134. 1997.
- PANKHURST, N.W., VAN DER KRAAK, G. Effects of stress on reproduction and growth of fish. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B.Ž. Eds., *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, 73–93, 1997.
- PLANAS, J. V., ATHOS, J., GOETZ, F. W., SWANSON, P. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish. *Biology of Reproduction*, 62: 1262–1269. 2000.
- RODRIGUES-FILHO, J. A. Alterações morfológicas e hormonais das gônadas e da hipófise da garoupa *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae) durante a inversão sexual. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 134 pg, 2010.
- RODRIGUES-FILHO, J.A., SANCHES, E.G., GARCIA, C.E.O., PANNUTI, C.V., SEBASTIANI E.F., MOREIRA, R.G. Threatened fishes of the world: *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Serranidae: Epinephelinae). *Environmental Biology of Fishes*, 85: 301-302, 2009.
- SÃO PAULO. Decreto Estadual no 53494-2008 de 02 de outubro de 2008. Diário Oficial do Estado de São Paulo 118(187). Secretaria do Meio Ambiente. 2008.
- SCHALLY, A.V. Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. *Science*, 202: 18–28. 1978.
- SETIAWAN, A. N., OZAKI, Y., SHOAE, A., KAZETO, Y., LOKMAN, P.M. Androgen-specific regulation of FSH signaling in the previtellogenic ovary and pituitary of the New Zealand shortfinned eel, *Anguilla australis*. *General and Comparative Endocrinology*, 176 :132–143. 2012.

- SCHRECK, C.B., CONTRERAS-SANCHEZ, W., FITZPATRICK, M.S. Effects of stress in fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, 197:3-24. 2001.
- SHIMIZU, A., OHKUBO, M., HAMAGUCHI, M. Development of non-competitive enzyme-linked immunosorbent assays for mummichog *Fundulus heteroclitus* gonadotropins – Examining seasonal variations in plasma FSH and LH levels in both sexes. *General and Comparative Endocrinology*. 178: 463–469. 2012.
- SHIMIZU, A., HAMAGUCHI, M., ITO, H., OHKUBO, M., UDAGAWA, M., FUJII, K., KOBAYASHI, T., NAKAMURA, M. Appearances and chronological changes of mummichog *Fundulus heteroclitus* FSH cells and LH cells during ontogeny, sexual differentiation, and gonadal development, *General Comparative Endocrinology*, 156: 312–322. 2008.
- SPECKER, J. L., SULLIVAN, C. V. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. In: Davey, K.G., Peter, R.E., Tobe, S.S. (Eds.), *Perspectives in Comparative Endocrinology*. National Research Council Canada, Ottawa, pp. 304–331. 1994.
- SPEDICATO, M.T., G. LEMBO, P. DI MARCO AND G. MARINO. Preliminary results in the breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cah. Options. Mediterranean.*, 16:131-148. 1995.
- STEVEN, C. Studies on the GnRH–GtH system of female striped bass (*Morone saxatilis*): effects of GnRH agonist therapy and comparison of reproductive endocrine parameters between wild and captive fish. *Marine Estuarine and Environmental Sciences*. University of Maryland, College Park. 2000.
- SUZUKI, K., NAGAHAMA, Y., KAWAUCHI, H. Steroidogenic activities of two distinct salmon gonadotropins. *General and Comparative Endocrinology*, 71: 452–458. 1988.
- SWANSON, P. Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas, in: Scott A. P., Sumpter J. P., Kime D. E., Rolfe M. S. (Eds.), *Reproductive Physiology of Fish*, Sheffield: Fish Symposium, p 2–7. 1991.

- TARANGER, G. L., CARRILLO, M., SCHULZ, R.W., FONTAINE, P., ZANUY, S., FELIP, A., WELTZIEN, F., DUFOUR, S., KARLSEN, Ø., NORBERG, B., ANDERSSON, E., HANSEN, T. Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 483-515. 2010.
- TRUDEAU, V. L. Comparative neuroendocrinology: integration of hormonal and environmental signals in vertebrates and invertebrates. *Comparative Biochemistry Physiology*. 144A: 243-246. 2006.
- SWANSON, P., DICKEY, J.T., Campbell, B. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry*. 28, 53–59. 2003.
- VON IHERING, R. A method for inducing spawning in fish. *Progressive Fish Culturist*, 34: 15–16. 1937.
- YARON, Z. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, 129, 49–73, 1995.
- YOUNG, G., KUSAKABE, M., NAKAMURA, I. Gonadal steroidogenesis in Teleost Fish. In: *Hormones and their Receptors in Fish Reproduction*. Melamed & Sherwood, World Scientific, v4, 155.
- ZOHAR, Y. Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. In: Shilo, M., Sarig, S. (Eds.), *Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends*. CRC Press, Boca Raton, 65–119. 1989.
- ZOHAR, Y. MYLONAS, C. C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormone to genes. *Aquaculture*, 197:99-136, 2001.
- ZOHAR, Y., MUÑOZ-CUETO, J. A., ELIZUR, A., KAH, O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 438-455, 2010.