

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Caracterização de folículos ovarianos de *Astyanax altiparanae* submetidos à indução hormonal *in vitro* com diferentes agentes indutores.**

**Queila Carla Ameno Alves**

**JABOTICABAL - SP**  
**1º SEMESTRE/2025**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Caracterização de folículos ovarianos de *Astyanax altiparanae* submetidos à indução hormonal *in vitro* com diferentes agentes indutores.**

**Queila Carla Ameno Alves**

Orientador: Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
– Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte  
das exigências para graduação em Zootecnia.

Jaboticabal - SP  
1º Semestre/ 10º período

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C278c | <p>Carla Ameno Alves, Queila</p> <p>Caracterização de folículos ovarianos de <i>Astyanax altiparanae</i> submetidos à indução hormonal in vitro com diferentes agentes indutores / Queila Carla Ameno Alves. -- Jaboticabal, 2025</p> <p>36 p. : il., fotos</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Sergio Ricardo Batlouni</p> <p>Coorientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati, Cristiane Fernanda Benevente</p> <p>1. In vitro. 2. Reprodução induzida. 3. Reprodução de peixe. 4. Lambari. 5. Sustentabilidade. I. Título.</p> |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus Jaboticabal



**QUEILA CARLA AMENO ALVES**

**CARACTERIZAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS DE *ASTYANAX  
ALTIPARANAE* SUBMETIDOS À INDUÇÃO HORMONAL *IN VITRO* COM  
DIFERENTES AGENTES INDUTORES.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni

Coorientador (se houver): Prof<sup>a</sup>. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati e  
Dra. Cristiane F. Benevente

Área de Concentração: Reprodução animal

Data da defesa: 30/06/2025

( x ) Aprovado

( ) Reprovado

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 **SERGIO RICARDO BATLOUNI**  
Data: 01/07/2025 09:16:03-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Documento assinado digitalmente  
 **LAIZA MARIA DE JESUS SILVA**  
Data: 03/07/2025 20:46:53-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Laíza Maria de Jesus Silva

Empresa Lambaricultura

Documento assinado digitalmente  
 **ROOSEVELT PASSOS BARBOSA**  
Data: 01/07/2025 17:47:50-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Me. Roosevelt Passos Barbosa

Instituto Federal do Amazonas

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em:

17/ 07 / 2025



Assinado de forma digital por  
Leonardo Susumu  
Takahashi: 27303089896  
Dados: 2025.07.17 10:38:06  
-03'00'

Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi

Chefe do Departamento

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Seção Técnica de Graduação  
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 Jaboticabal/SP - Brasil  
Tel (16) 3209 7106 e-mail: [graduacao.fcav@unesp.br](mailto:graduacao.fcav@unesp.br) - [www.fcav.unesp.br](http://www.fcav.unesp.br)

## **OFERECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, que esteve comigo em cada etapa dessa jornada, me dando coragem, força e sabedoria para seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis que passei durante a pandemia, sem sua graça, nada disso teria sido possível.

Aos meus pais e meus irmãos, que foram o meu porto seguro, alicerce, que acreditaram em mim e que me deram força de continuar na universidade, mesmo diante dos desafios. Por todo o amor, apoio e sacrifícios feitos para que eu chegasse até aqui, sou eternamente grata.

Gostaria de dedicar também meu trabalho à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal. A instituição foi fundamental na minha formação, proporcionando uma base sólida e contando com docentes excepcionais que foram essenciais para o sucesso dos meus estudos.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu laboratório de reprodução de peixes, onde pude ver o quanto cresci como profissional e também como pude desenvolver o meu lado pesquisadora. Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni, por toda paciência, dedicação e por compartilhar seu conhecimento, sempre me motivando a seguir na área de reprodução. À minha co-orientadora, Cristiane Fernanda Benevente, pelos ensinamentos, pelos puxões de orelha (sempre necessários) e por sido como uma irmã mais velha nessa caminhada, sua presença fez toda a diferença. Aos meus colegas de laboratório Laiza, Mari, Roosevelt e Felipe, obrigada pela troca de experiências, pela parceria nos experimentos e por todos os momentos de descontração, seja no laboratório ou no churrasco na casa do Sergio, que tornaram nosso dia a dia muito mais leve e divertido.

Às minhas amigas de sala Camis, Desli, Dolirou, Filipa e Xitão, sentirei muita falta de cada uma, principalmente de cada desafio que passamos juntas, cada perrengue (que só nós sabemos o que passamos haha) das risadas altas, dos trabalhos infinitos, dos rolês inesquecíveis e de cada café tomado seja na cantina ou na padaria, sem dúvida, tornando essa trajetória muito mais leve e divertida. Nossa amizade foi construída com muito carinho ao longo dos anos, e a cada semestre ficou mais forte. Levarei vocês comigo para sempre, até breve!

Às minhas amigas da minha república Santa Casa, que se tornaram minha segunda família (Madre, Lilice, Crystal, Match, Pantanal, TPM, Marcony e Tombei), e principalmente minha companheira 020 Manguêra, que esteve ao meu lado na fase mais difícil da pandemia. Obrigada por cada conversa, cada risada, cada abraço nos dias difíceis e por todas as memórias incríveis que construímos juntas. A convivência com cada uma de vocês fez minha jornada ser ainda mais especial #moreemrep sempre! E não poderia deixar de mencionar, nossa amada Zara (*in memoriam*), que nos deixou no final de novembro de 2024, mas que estará para sempre nos nossos corações. Zara foi um pedaço da nossa família, sempre nos recebendo com festa nos dias bons e nos confortando nos dias difíceis. Sua presença tornava nossa casa mais leve, mais feliz e cheia de vida. Sentirei saudades do seu jeitinho único, das suas travessuras pulando em camas alheias, do carinho incondicional e de cada momento em que, sem precisar dizer nada, ela nos lembrava que éramos amadas. O vazio deixado por sua partida nunca poderá ser preenchido, mas as memórias que construímos ao seu lado serão eternas. Você foi, e sempre será, parte de nós!

Às minhas amigas da minha cidade, Ana e Gih, que mesmo com o término da escola, nunca deixaram de estar presentes. Obrigada por cada reencontro semestral quando eu voltava para Bebedouro, para deixar as fofocas em dia. Por sempre torcerem por mim, me apoiarem e me lembrarem das minhas raízes. Saber que posso contar com vocês, não importando a distância, é um conforto enorme.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho, meu sincero agradecimento, pelo incentivo e carinho de todas essas pessoas especiais que fizeram parte da minha vida durante a minha trajetória em Jabuka. Muito obrigada.

## Lista de figuras e imagens.

|                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.Design experimental dos tratamentos <i>in vitro</i> de folículos ovarianos de <i>Astyanax altiparanae</i> .....                                                                                            | 8  |
| Imagem 1. Shaker de agitação .....                                                                                                                                                                                  | 9  |
| Imagem 2. Micrótoomo e lâmina corada (H.E).....                                                                                                                                                                     | 10 |
| Imagem 3. Amostras.....                                                                                                                                                                                             | 11 |
| Imagem 4. Amostras desidratadas e metalização .....                                                                                                                                                                 | 12 |
| Imagem 5. Obtenção das micrografias em microscopia de varredura.....                                                                                                                                                | 12 |
| Imagem 6. Infiltração da resina e Cortes ultrafinos.....                                                                                                                                                            | 13 |
| Imagem 7. Amostras para análise em microscopia eletrônica de transmissão.....                                                                                                                                       | 14 |
| Figura 2. Análise <i>in vitro</i> de folículos ovarianos de <i>Astyanax</i> . Micrografias obtidas por histologia (A, D, E) e por MEV (B, C, F, G,H) de folículos ovarianos submetidos a distintos tratamentos..... | 16 |
| Figura 3. Análise <i>in vitro</i> de folículos ovarianos de <i>Astyanax altiparanae</i> . Micrografias obtidas por MET (A, B, C, D, E, F, G, H) de folículos ovarianos submetidos a distintos tratamentos.....      | 19 |



## ÍNDICE

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 1.INTRODUÇÃO.....                   | 1  |
| 2.OBJETIVO .....                    | 3  |
| 3.REVISÃO DA LITERATURA.....        | 3  |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....          | 5  |
| 4.1 Comitê de ética .....           | 5  |
| 4.2 Delineamento experimental.....  | 6  |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO: .....    | 15 |
| 6. CONCLUSÃO:.....                  | 21 |
| 7. RESUMO.....                      | 22 |
| 8. ABSTRACT .....                   | 23 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 24 |

## 1. INTRODUÇÃO

A produção aquícola brasileira tem apresentado crescimento consistente nos últimos anos, consolidando-se como uma atividade em plena expansão no país. Em 2023, a produção de peixes cultivados atingiu 888.029 toneladas, representando um aumento de 55% em relação a 2022 (PEIXE BR 2023). A tilápia (*Oreochromis niloticus*), uma espécie exótica, segue como principal espécie produzida, com produção de 592.978 toneladas, correspondendo a 66,8% da produção nacional e apresentando um crescimento de 7,4% (PEIXE BR 2023). Notadamente a produção de tilápia em cativeiro é o carro-chefe da piscicultura nacional com grande importância para desenvolvimento do setor. Já a produção de peixes nativos representou 27,7% do total, atingindo 246.004 toneladas em 2023, com um recuo de 2,2% em relação a 2022 (PEIXE BR 2023). Porém, esta atividade apresentou recuo de 5,85% em relação a produção de 2020 (278.671t) (PEIXE BR 2020), a qual, por sua vez, já havia recuado 3,2% em relação a 2019 (287.930 t) (PEIXE BR 2021). Portanto, inversamente a produção de tilápias, apesar de sua importância para a piscicultura nacional, a produção de peixes nativos vem tendo seu espaço reduzido. O cenário atual (ou seja, declínio na produção de espécies nativas e expansão da criação de tilápias) pode acarretar redução da diversidade de espécies cultivadas no Brasil, o que afeta a sustentabilidade da aquicultura nacional (CAI et al., 2022). Notavelmente, a falha na ovulação foi identificada como um dos três principais desafios na piscicultura global (BOBE & LABBÉ, 2010), impactando significativamente espécies que requerem indução hormonal para a desova, como a maioria das espécies nativas brasileiras. Alcançar o controle sobre a maturação sexual, a desova e a produção de juvenis de alta qualidade é considerado essencial para o desenvolvimento da aquicultura (MIGAUD et al., 2013). Portanto, abordar essas questões deve ser uma prioridade para aumentar a produção de peixes nativos no Brasil.

O lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) pertencente à ordem dos Characiformes, é utilizado como isca viva para pesca esportiva (SABBAG et al., 2011; VALLADÃO, GALLANI & PILARSKI, 2018). Ademais, os lambaris são de fácil manipulação por serem de pequeno porte e de fácil manuseio (SABBAG et al., 2011; VALLADÃO et al., 2018), alcançam um comprimento de aproximadamente 20 cm e possuem massa máxima de 40 gramas, sendo amarelas as nadadeiras, escamas com reflexos prateadas e com mancha alongada

que vai até a ponta dos raios caudais medianos. (BRITSKI et al., 1988; CEMIG/CETEC, 2000), e possuem um ciclo de produção de quatro meses (VALENTI et al., 2021). Nos últimos anos, a criação de lambari tem apresentado crescimento significativo, impulsionada pela expansão do mercado, tanto para o segmento de isca quanto para consumo em escala regional (FONSECA et al., 2022). Atualmente, sua produção nacional ultrapassa mil toneladas anuais (VALENTI et al., 2021) e ocorre em mais de 23.000 propriedades aquícolas no Brasil (PEIXE BR, 2020).

A reprodução de peixes é influenciada por estímulos ambientais captados por receptores sensoriais no hipotálamo, o qual está conectado à hipófise, um importante órgão endócrino, por meio de um pedúnculo composto de fibras neurosecretores (BALDISSEROTTO, 2013; ZOHAR et al., 2010). A hipófise é regulada por diversos neuropeptídios que são produzidos por neurônios específicos (ZOHAR et al., 2010), desempenhando um papel essencial na produção e regulação das gonadotrofinas, como o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) (PETER & YU, 1997; LEVAVI-SIVAN et al., 2010, YARON & LEVAVI-SIVAN; 2011). De acordo com MEHDI e EHSAN (2011), o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas possibilita a sincronização de todos os processos associados ao ciclo reprodutivo dos peixes. O FSH atua nas células da teca, convertendo colesterol em testosterona, que se difunde para as células foliculares, onde é transformada em  $17\beta$ -estradiol (E2) pela ação da enzima aromatase P450 (BALDISSEROTTO, 2013). O E2 então age no fígado, estimulando a síntese de vitelogenina (NAGAHAMA & YAMASHITA, 2008). Por sua vez, o LH atua nas células foliculares, promovendo a produção de  $17\alpha$ -20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP), sendo este hormônio fundamental para a maturação final dos ovócitos e, conseqüentemente, para o processo de ovulação (CRESPO et al., 2013; TAKAHASHI et al., 2016).

O DHP atua diretamente na retomada da meiose dos ovócitos, ligando-se a receptores específicos presentes na membrana plasmática do ovócito e ativando uma cascata molecular que envolve os fatores promotores da maturação, especialmente o complexo (cdc2-quinase e a ciclina-B) (NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008). Essa ativação desencadeia uma série de eventos morfológicos, como a migração da vesícula germinativa (núcleo) em direção ao polo animal, seguida pela ruptura da membrana nuclear – fenômeno conhecido como ruptura da vesícula germinativa (GVBD) -, além da condensação cromossômica, montagem do fuso meiótico e emissão do primeiro corpúsculo polar, eventos que são essenciais para a competência do ovócito à fertilização (NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008). Além de seu papel crucial na

maturação final, o DHP também participa do processo de ovulação, atuando por meio de sua interação com receptores nucleares, o que leva à indução de genes responsáveis pela síntese e expressão de receptores de prostaglandinas (PGF2 $\alpha$ ). Essa prostaglandina desempenha um papel chave na contração das células da teca e do folículo, promovendo a ruptura folicular e, conseqüentemente, a liberação do ovócito (TAKAHASHI et al., 2013).

## **2. OBJETIVO**

Desenvolvemos anteriormente um experimento para avaliar o efeito de duas substâncias potentes indutoras de ovulação *in vitro* do lambari: o 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP) e a prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ). Observamos anteriormente que todos os tratamentos que incluíam 1 $\mu$ g DHP mL com ou sem associação com distintas doses de PGF2 $\alpha$  apresentaram ovulação bem-sucedida; mas de forma surpreendente, o tratamento com 5000ng PGF2 $\alpha$  mL foi capaz de induzir a ovulação independentemente do uso de DHP. Estes resultados foram analisados anteriormente pela visualização da posição e integridade do núcleo por meio de uso líquido de Serra e análise em estereomicroscópio. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar histologicamente, por meio de MEV e MET as características dos ovócitos de cada tratamento, com o objetivo de confirmar com uma técnica de maior resolução se estes ovócitos estavam realmente ovulados e qual era seu aspecto.

## **3. REVISÃO DA LITERATURA**

O desenvolvimento ovocitário em peixes tem sido amplamente estudado por diversos pesquisadores (BEGOVAC & WALLACE, 1988; BAZZOLI & RIZZO, 1990; TYLER & SUMPTER, 1996; GRIER, 2000 e 2002). Similarmente ao observado em outros animais, o desenvolvimento dos ovócitos segue as fases pré-meiótica, pré-vitelogênico, vitelogênico e de maturação final. Essas etapas ocorrem de acordo com o ciclo reprodutivo do animal, durante o qual os ovócitos passam por diferentes estágios de crescimento, diferenciação e maturação (WALLACE & SELMAN, 1981). Tais fases acontecem no interior de folículos onde a parede é formada pela zona radiata, camada folicular, membrana basal e teca (GRIER, 2000).

Os ovários de teleósteos consistem em oogônias, oócitos e células foliculares circundantes, tecido de suporte ou estroma e tecido vascular e nervoso (NAGAHAMA, 1994). O desenvolvimento ovariano pode ser analisado macroscopicamente com as alterações de forma,

tamanho, cor e textura das gônadas (VAZZOLER, 1996; WALLACE & SELLMAN, 1981). Com o crescimento dos ovócitos, as células foliculares se multiplicam e formam uma camada folicular contínua (camada de células da granulosa). Simultaneamente, os elementos do tecido conjuntivo estromal circundante também se organizam para formar a camada externa distinta do envelope folicular (a camada tecal). Portanto, os oócitos vitelogênicos, como os de outros vertebrados, são compostos de duas camadas celulares principais, uma camada externa de células da teca e uma camada interna de células da granulosa, separadas uma da outra por uma membrana basal distinta (NAGAHAMA, 1994).

Desde a década de 1970, cientistas de diversos países que reproduzem espécies em cativeiro (JALABERT et al., 1977; JALABERT & SZÖLLÖSI, 1975; FUJIMORI et al., 2011; TANG et al., 2016 e 2017) têm investigado sistemas in vitro para compreender tanto as causas de falhas na ovulação quanto os mecanismos que regulam esse processo.

Uma das principais vantagens dos estudos in vitro é a possibilidade de testar, de forma eficiente e em um curto período, uma ampla variedade de hormônios e dosagens. Os sistemas de cultivo celular permitem gerar dados em uma escala mais reduzida e controlada (in vitro), contribuindo para a redução no uso de peixes e hormônios. A aplicação direta de agentes hormonais em culturas in vitro, que aparentam desempenhar um papel relevante na maturação final dos oócitos e na ovulação, tem sido amplamente empregada. Essa abordagem possibilitou o desenvolvimento de protocolos precisos para diversas espécies cultivadas globalmente (JALABERT & SZÖLLÖSI, 1975; HAGIWARA et al., 2014; TANG et al., 2016 e 2017).

Uma forma de avaliar a viabilidade de oócitos e células foliculares seria a análise morfológica e ultraestrutural e métodos de coloração específicos associados à histologia clássica (GORDON, 1994). Dessa forma, a caracterização histológica das células foliculares de lambari requer técnicas mais avançadas, como a microscopia eletrônica de varredura (MEV), que permite a visualização detalhada da superfície celular em alta resolução. Essa técnica é fundamental para a observação das características morfológicas externas das células, possibilitando a análise da topografia, textura e integridade da superfície celular (DE CASTRO, 2002) sendo importante para entender a fisiologia reprodutiva do lambari e podendo contribuir para o desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação da espécie.

Além do MEV, o microscópio eletrônico de transmissão (MET) desempenha um papel fundamental na análise de materiais biológicos, permitindo a obtenção de imagens detalhadas do

interior celular. Essa técnica viabiliza investigações aprofundadas sobre a morfologia das células e a estrutura de suas organelas. Um MET moderno é composto por cinco a seis lentes magnéticas, além de bobinas eletromagnéticas de deflexão e aberturas estrategicamente posicionadas ao longo do percurso do feixe eletrônico. Entre esses elementos, destacam-se três componentes essenciais para os fenômenos de difração eletrônica: a lente objetiva, a abertura objetiva e a abertura seletiva de difração. As lentes projetoras, por sua vez, tem a função de direcionar o feixe de elétrons de maneira paralela, garantindo intensidade suficiente para a incidência sobre a amostra (GRIMSTONE, 1980; GALLETI, 2003).

A formação das imagens ocorre a partir da interação inicial do feixe de elétrons com a amostra, que precisa ser mantida sob alto vácuo. Tanto a exposição ao vácuo quanto a irradiação eletrônica durante a análise podem comprometer a integridade da amostra, o que representa um desafio significativo, especialmente para materiais biológicos, conhecidos por sua fragilidade e delicadeza (FARINA, 1998; KITAJIMA, 1998). No contexto da reprodução, a MET é importante para entender a fisiologia reprodutiva do *Astyanax altiparanae*, possibilitando uma análise minuciosa das células foliculares e podendo contribuir para o desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação da espécie.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Comitê de ética**

O projeto foi submetido e aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o nº 1578/21, de acordo com os preceitos de lei e normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e, depositado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN sob o cadastro ADF2D24.

## 4.2 Delineamento experimental

Para o desenvolvimento do projeto, foram utilizadas fêmeas adultas e maduras de *A. altiparanae*, os peixes foram mantidos em viveiros de 200m<sup>2</sup> com densidade de 50 peixes por m<sup>2</sup> com abastecimento de água de aproximadamente, 20L min.

Para a seleção das fêmeas maduras, foram analisados aspectos morfológicos externos, tais como: ausência de espícula na nadadeira anal, ventre abaulado e macio, papila urogenital proeminente e avermelhada. Após a seleção, as fêmeas foram alocadas em baldes com aeradores, levados para o laboratório e eutanasiadas por excesso de anestésico (benzocaína 0,5g/L). Após esta etapa, foi feita uma incisão abdominal lateral para a retirada dos ovários.

Para a indução hormonal *in vitro*, foram utilizadas 5 fêmeas maduras para retirada dos fragmentos ovarianos, esses fragmentos passaram por dissociação mecânica, a fim de separar os oócitos. Tal dissociação mecânica foi realizada no estereomicroscópio com o auxílio de duas seringas acopladas a agulhas (0,8 x 25mm). Após a dissociação mecânica, os folículos ovarianos com ovócitos vitelogênicos completos foram mantidos em meio de cultura Leibovitz L-15 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a 25°C. Posteriormente foram transferidos para placa de Petri (35 X 10 mm) e cultivados em 4 mL de Leibovitz L-15 suplementado com 100 µg/mL de gentamicina (pH 7,5). Para isto, cada unidade experimental (placa de 3 ml com aproximadamente 30 folículos) foi mantida por 7 horas em leve agitação em Shaker de bancada (45 rpm) (Imagem 1) com temperatura controlada entre 26-28°C fazendo troca de 1,5 ml de meio de cultura a cada 30 minutos.

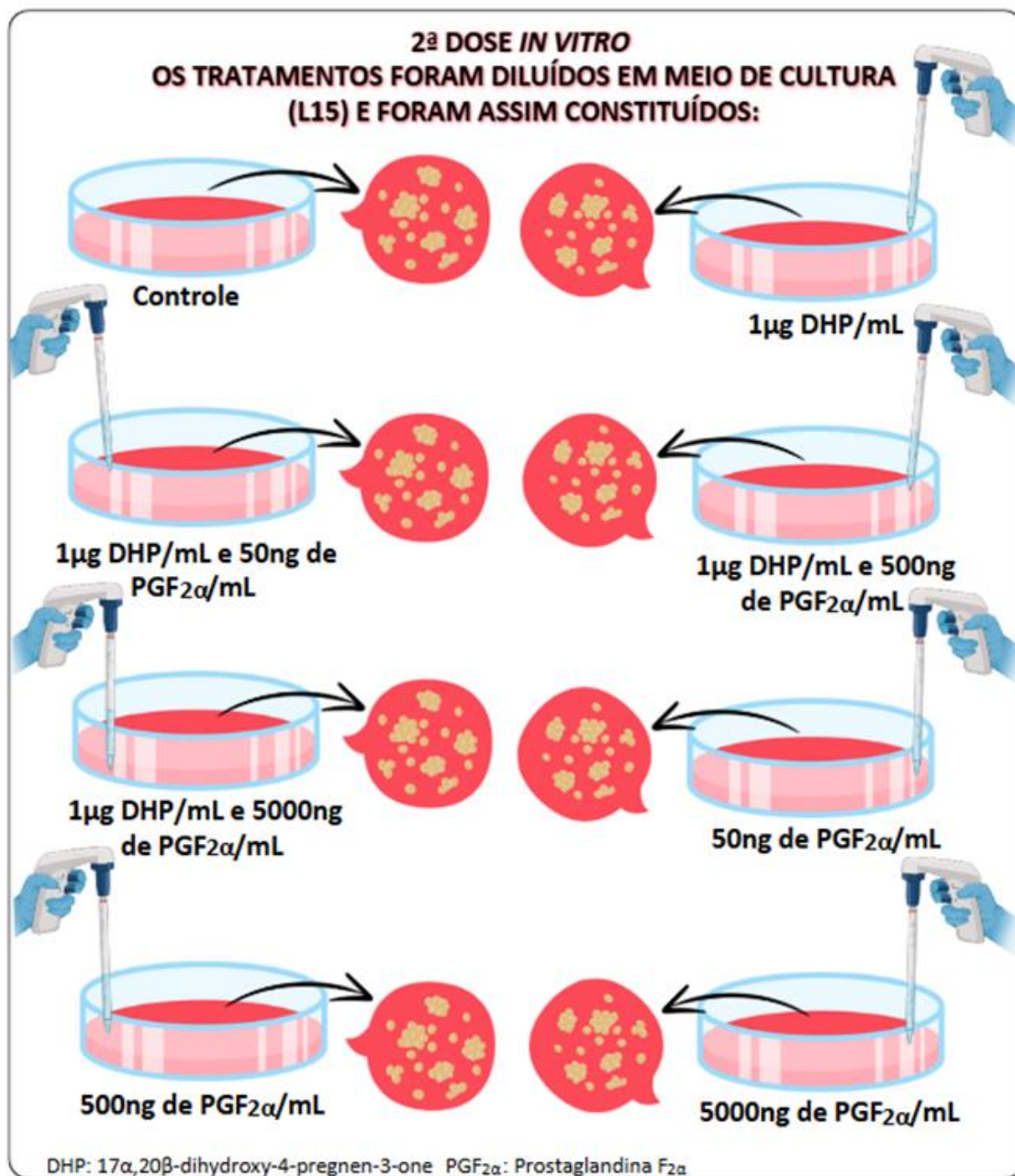
Todos os tratamentos (Figura 1) tiveram a primeira dose hormonal *in vivo* e a segunda dose *in vitro* (o grupo controle não recebeu a segunda dose, seus folículos foram mantidos apenas no meio de cultura Leibovitz L-15). Os tratamentos foram assim constituídos:

- Controle - 1ª dose *in vivo* (0.6 mg.Kg EBHC - Extrato bruto de hipófise de carpa). Incubação *in vitro* somente com meio de cultura.
- 1µg DHP - 1ª dose *in vivo* (0.6 mg.Kg-1 EBHC). Incubação *in vitro* com 1ug DHP/mL de meio de cultura L-15

- 1 $\mu$ g DHP + 50ng PGF2 $\alpha$  - 1<sup>a</sup> dose *in vivo* (0.6 mg.Kg/ EBHC). Incubação *in vitro* com 1 $\mu$ g DHP/mL e 50ng de PGF2 $\alpha$  /mL de meio de cultura L-15
- 1 $\mu$ g DHP + 500ng PGF2 $\alpha$  - 1<sup>a</sup> dose *in vivo* (0.6 mg.Kg/ EBHC). Incubação *in vitro* com 1 $\mu$ g DHP/mL e 500 ng de PGF2 $\alpha$  /mL de meio de cultura L-15
- 1 $\mu$ g DHP + 5000ng PGF2 $\alpha$  - 1<sup>a</sup> dose *in vivo* (0.6 mg.Kg/ EBHC). Incubação *in vitro* com 1 $\mu$ g DHP/mL e 5000 ng de PGF2 $\alpha$  /mL de meio de cultura L-15
- 50ng PGF2 $\alpha$  - 1<sup>a</sup> dose *in vivo* (0.6 mg.Kg/ EBHC). Incubação *in vitro* com 50ng de PGF2 $\alpha$ /mL de meio de cultura L-15
- 500ng PGF2 $\alpha$  - 1<sup>a</sup> dose *in vivo* (0.6 mg.Kg/ EBHC). Incubação *in vitro* com 500ng de PGF2 $\alpha$  /mL de meio de cultura L-15
- 5000ng PGF2 $\alpha$  - 1<sup>a</sup> dose *in vivo* (0.6 mg.Kg/ EBHC). Incubação *in vitro* com 5000ng de PGF2 $\alpha$  /mL de meio de cultura L-15

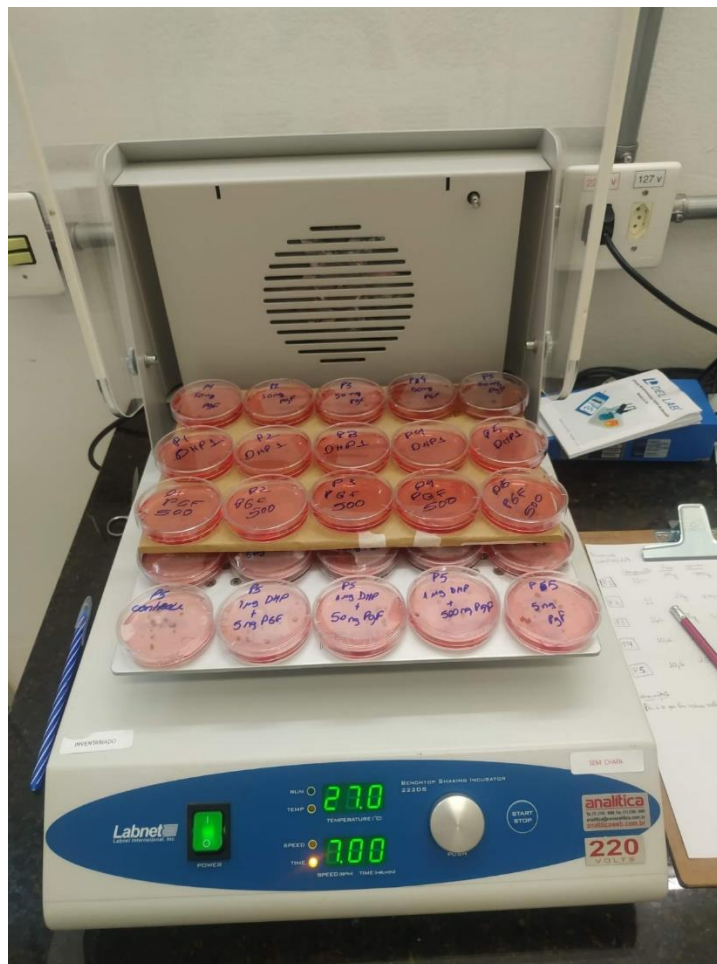


Figura 1. Design experimental dos tratamentos in vitro de folículos ovarianos de *Astyanax altiparanae*.



Fonte: Canva – arquivo pessoal

Imagem 1. Shaker de agitação



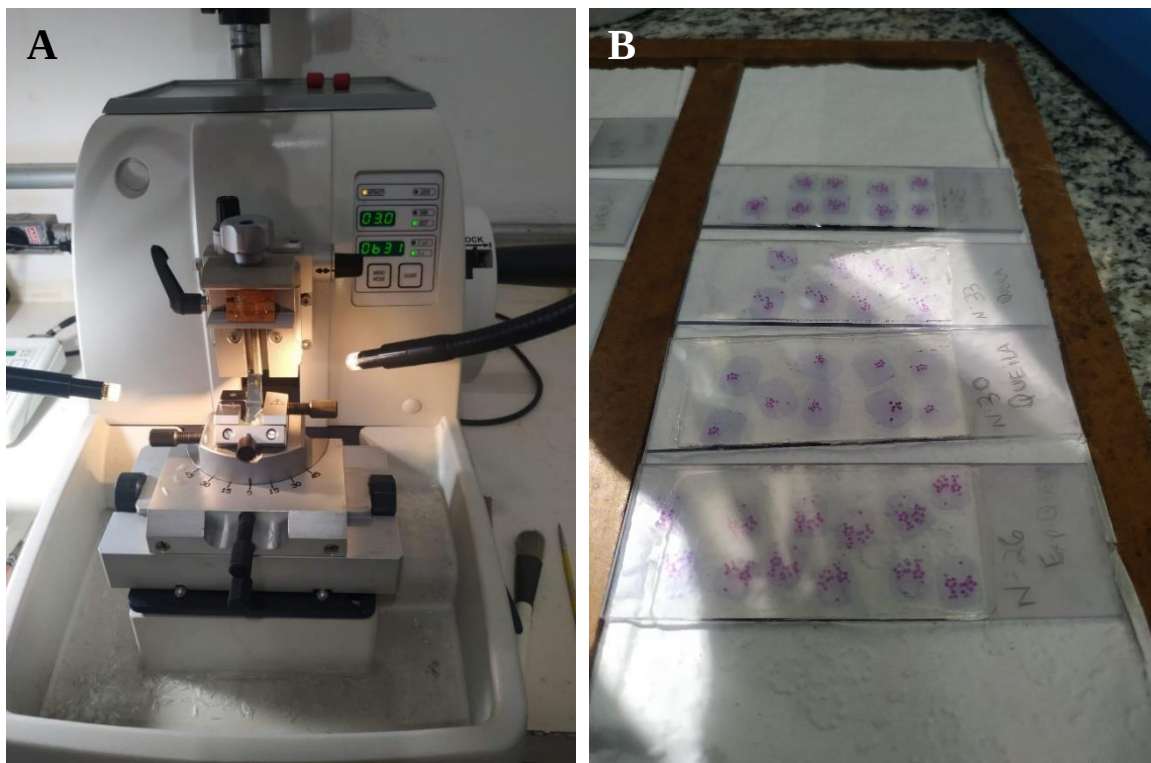
(Fonte: Arquivo pessoal)

Para as análises histológicas dos folículos pós-tratamento, o pellet obtido contendo os folículos de cada tratamento foram processados para histologia convencional para descrição de suas características morfológicas em cada tratamento.

No procedimento histológico a amostra foi fixada 24 horas em solução Karnovsky modificada (4% paraformaldeído e 2% glutaraldeído em tampão fosfato de Sorensen, 0,1 M, pH 7,2) passando por álcool em ordem crescente de concentração (álcool 70% até 95%). Após a infiltração, a amostra foi incluída em Histo-resina (Technovit 7100, Kulzer Histo-Technik) e deixada para solidificar em temperatura ambiente. Com a amostra polimerizada, cortes finos entre 3 a 5µm foram feitos com micrótomo (Imagem 2A), que permite observar a amostra em

lâminas de microscopia. Os cortes foram então corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (H.E) (Imagem 2B), que permite a visualização das estruturas celulares.

*Imagem 2. Micrótopo e Lâmina corada (H.E)*



(Fonte: Arquivo pessoal)

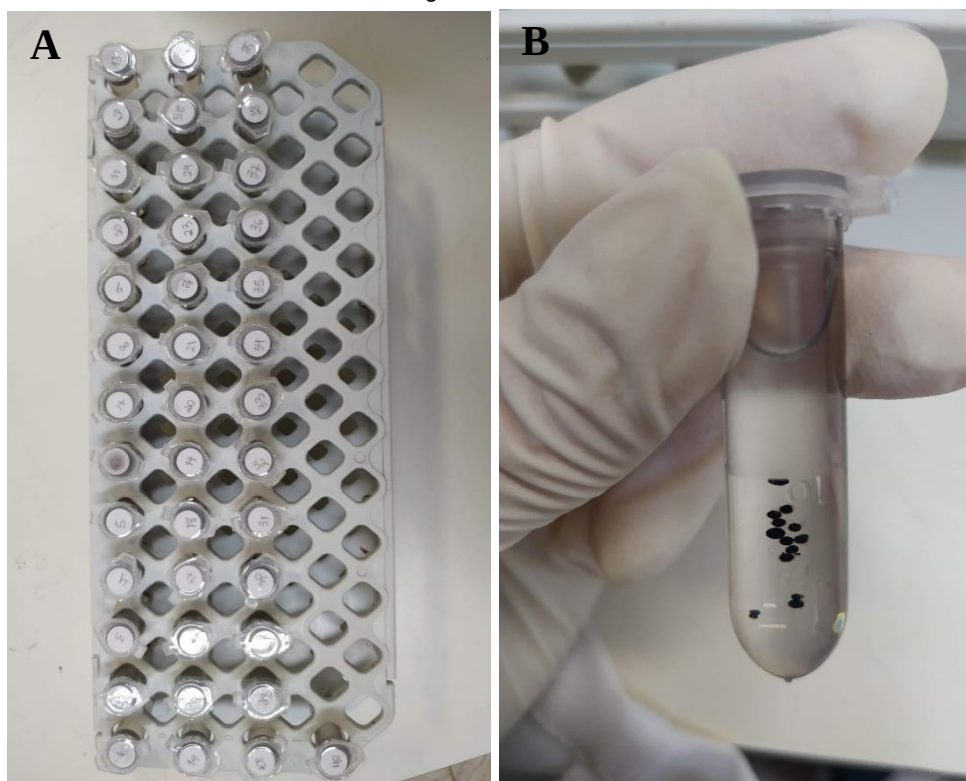
Foram selecionadas um total de 20 amostras (Imagem 3A) dos tratamentos: controle; 1µg DHP; 1µg DHP + 50ng PGF2α; 1µg DHP + 500ng PGF2α; 1µg DHP + 5000ng PGF2α; 50ng PGF2α; 500ng PGF2α e 5000ng PGF2α para o processamento de MEV e logo em seguida foram preparadas as seguintes soluções: tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2), soluções desidratantes alcoólicas a 30%, 50%, 70%, 80% e 90%, e solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2).

Após a remoção da solução fixadora de Karnovsky, as amostras foram lavadas três vezes com tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2). Em seguida, o tampão foi descartado, e as amostras foram fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% (Imagem 3B). Os tubos Eppendorf

contendo as amostras foram mantidos em capela de exaustão à temperatura ambiente por 24 horas.

Após o tempo de fixação, a solução de tetróxido de ósmio foi removida, e as amostras foram lavadas novamente três vezes com tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2). Posteriormente, iniciou-se o processo de desidratação (Imagem 4A) utilizando a série crescente de soluções alcoólicas a 30%, 50%, 70%, 80% e 90%, com imersão por 15 minutos em cada concentração, mantendo as amostras refrigeradas durante os intervalos. Finalmente, as amostras foram submetidas ao processo de metalização (Imagem 4B) e, em seguida, analisadas no microscópio eletrônico de varredura para obtenção das micrografias (Imagem 5A-B).

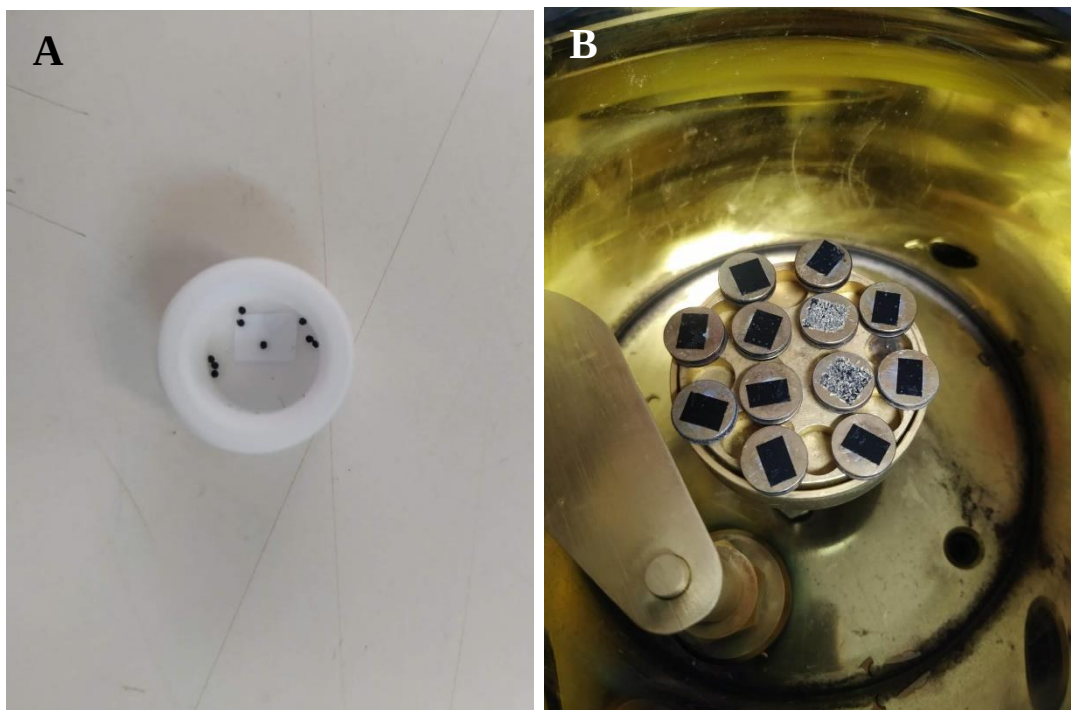
*Imagem 3. Amostras*



*(Fonte: Arquivo pessoal)*

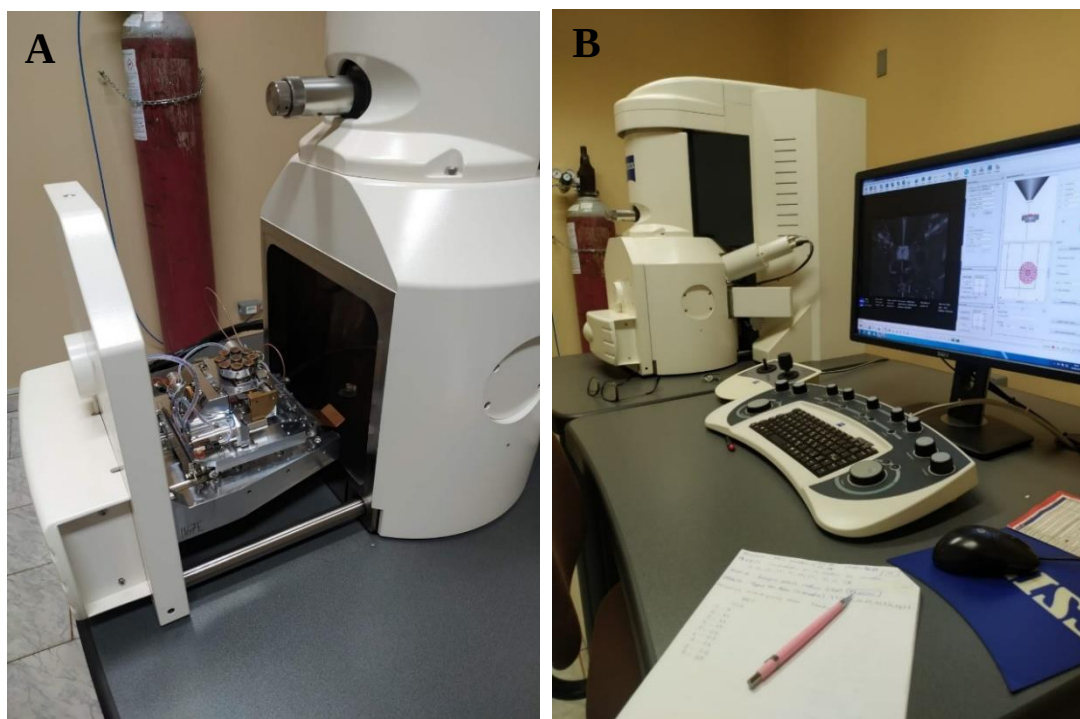


*Imagem 4. Amostras desidratadas e metalização*



*(Fonte: Arquivo pessoal)*

*Imagem 5. Obtenção das micrografias em MEV*

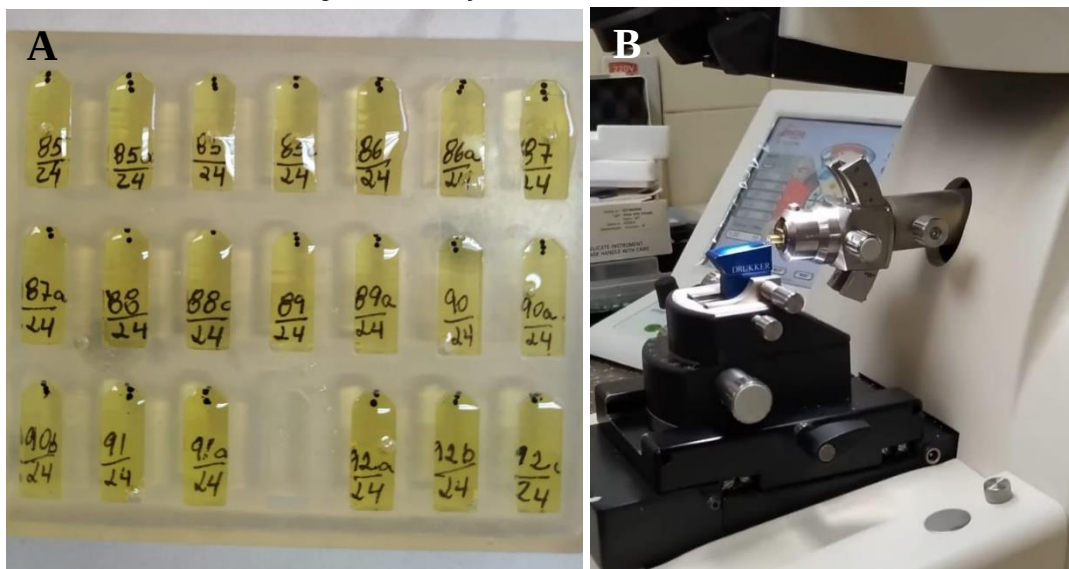


*(Fonte: Arquivo pessoal)*

Foram selecionadas 8 amostras submetidas à MET. Inicialmente, as amostras foram lavadas três vezes, por 10 minutos cada, em tampão 0,1 M correspondente ao fixador Karnovsky. Posteriormente, realizou-se a pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas, seguida de nova lavagem em tampão 0,1 M (três vezes por 10 minutos). As amostras foram então submetidas à impregnação com acetato de uranila a 1%, sendo deixadas em incubação na geladeira por um período de 12 a 18 horas ("overnight").

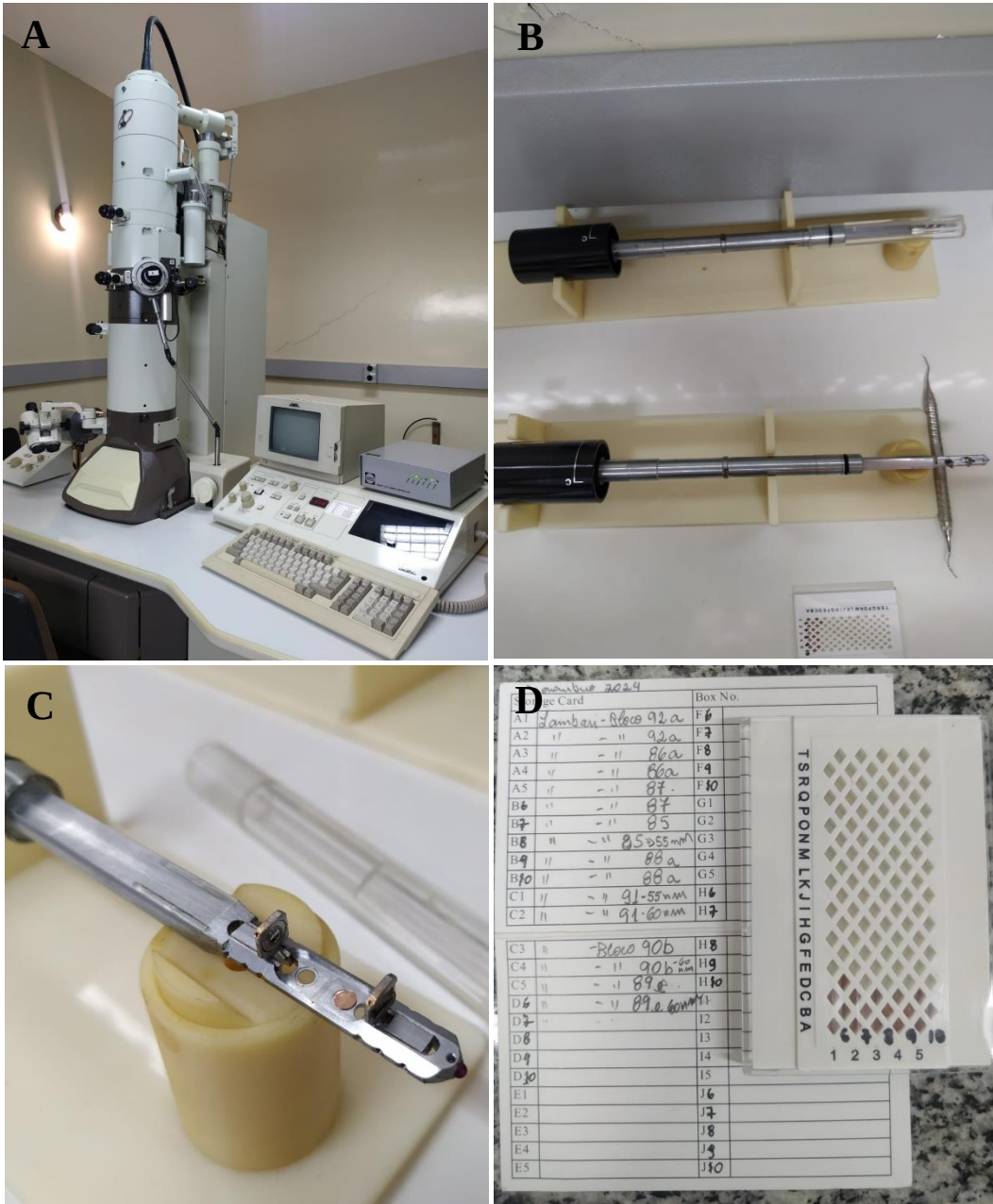
Em seguida, procedeu-se à desidratação em séries crescentes de acetona (Merck), com intervalos de 10 minutos em concentrações de 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%. A infiltração foi realizada com uma mistura 1:1 de resina (epon/eraldite) e acetona, por um período mínimo de 4 horas. Após essa etapa, as amostras foram colocadas em estufa a 70°C por 3 dias para a infiltração da resina (Imagem 6A). Por fim, os blocos foram desemblocados e submetidos à microtomia para obtenção dos cortes ultrafinos (Imagem 6B), em seguida, analisadas no MET (Imagem 7A-B-C-D) para obtenção das micrografias.

*Imagem 6. Infiltração de resina e cortes ultrafinos*



*(Fonte: Arquivo pessoal)*

Imagem 7. Amostras para análise em MET



(Fonte: Arquivo Pessoal)

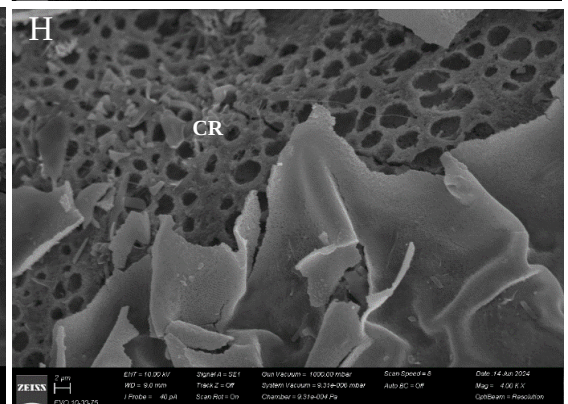
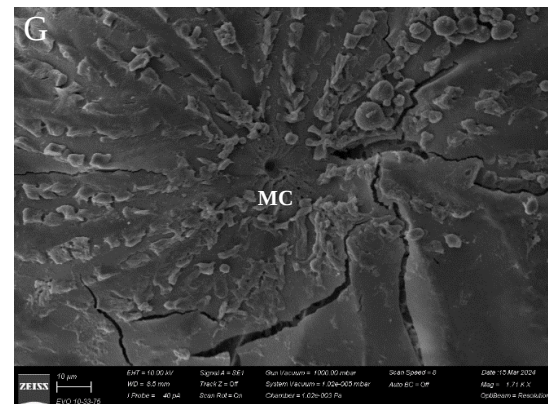
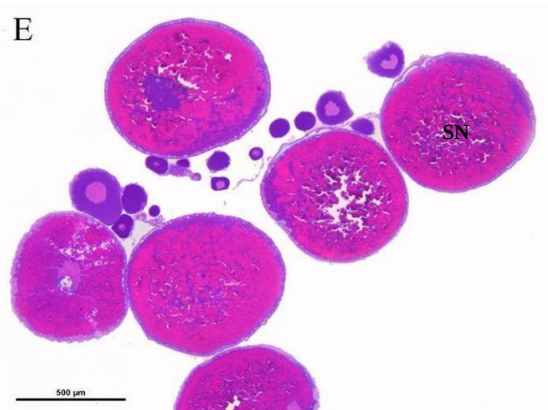
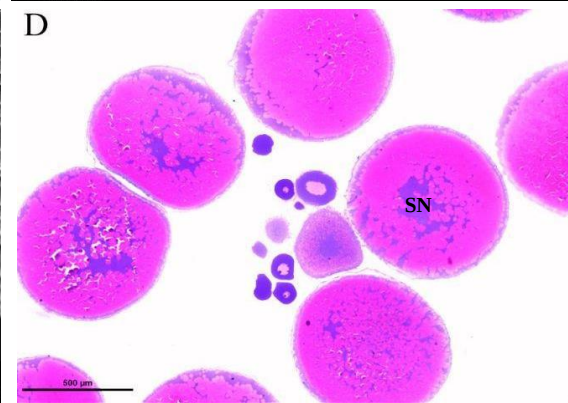
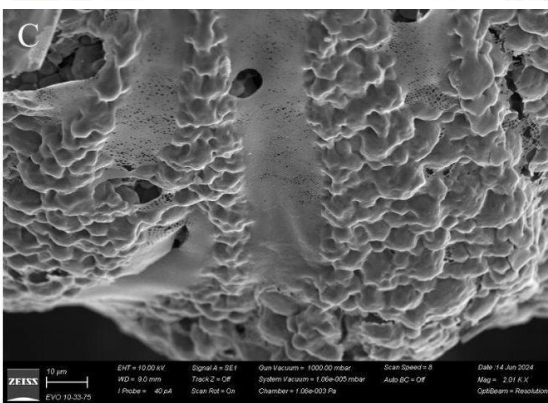
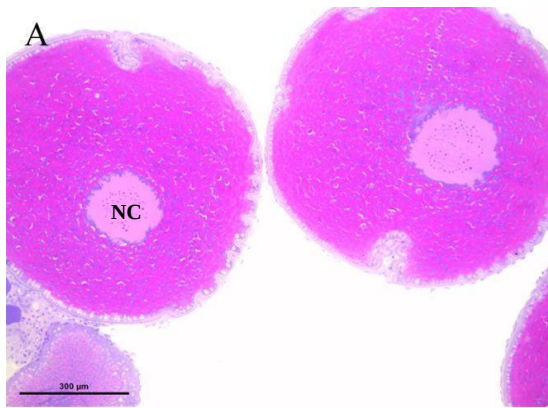
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

As observações por histologia e MEV confirmaram os resultados obtidos por análise em líquido de Serra e permitiram conclusões mais aprofundadas. Por meio de análises histológicas observamos que no tratamento controle, os folículos apresentaram predominantemente núcleos centrais e íntegros, no citoplasma os grânulos de vitelo apresentavam padrão homogêneo e externamente tanto por microscopia de luz como por varredura se observa ondulações na camada folicular (Figura 2A) que correspondiam as ranhuras encontradas nestes ovócitos (Figura 2C). No tratamento controle, as micrópilas estavam predominantemente fechadas (Figura 2B), uma característica associada a ovócitos em estágio imaturo, visto que durante a fase folicular o que se observa é a célula precursora da micrópila, que só se tornará a micrópila funcional após a ovulação, quando ocorre a perda da camada folicular (JALABERT; SZÖLLÖSI, 1975; HAGIWARA et al., 2020).

Os resultados obtidos por MET corroboram esses achados, revelando uma zona radiata (ZR) com aspecto eletrodenso, sem formação de poros ou sinais de modificação estrutural (Figura 3D). Essa morfologia é compatível com ovócitos que não retomaram a meiose e permanecem na fase vitelogênica final, sem os eventos celulares característicos da maturação final (WALLACE; SELMAN, 1981; NAGAHAMA, 1994; TYLER; SUMPTER, 1996).

Nos ovócitos submetidos ao tratamento com 1 µg de DHP/mL, observaram-se padrões morfológicos compatíveis com ovócitos em processo de maturação final e ovulação. A MEV evidenciou descontinuidade na camada folicular e micrópilas abertas (Figura 2G), enquanto a MET revelou heterogeneidade na organização da ZR, indicando uma possível variação individual na resposta dos ovócitos ao estímulo hormonal (HAGIWARA et al., 2020). Essa variação intra-grupo é comum em teleósteos, sendo atribuída tanto à heterogeneidade intrínseca do lote ovocitário quanto às diferenças na sensibilidade das células foliculares à indução hormonal (NAGAHAMA, 1994).





**Figura 2.** Análise *in vitro* de folículos ovarianos de *Astyanax altiparanae*. Micrografias obtidas por histologia (A, D, E) e por MEV (B, C, F, G, H) de folículos ovarianos submetidos a distintos tratamentos: A, B e C: controles. D, F, G: 1µg DHP/mL. E, H: 5000ng PGF2α/mL. Barra de escala: (A)500µm. (B, F,)20µm. (C, G)10µm. (D, E)500µm. (H)2µm. NC: núcleo central. SN: sem núcleo. MC: micrópila. CR: córion

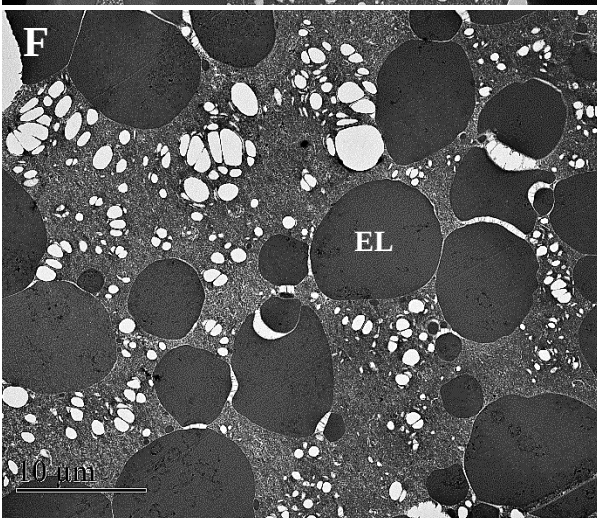
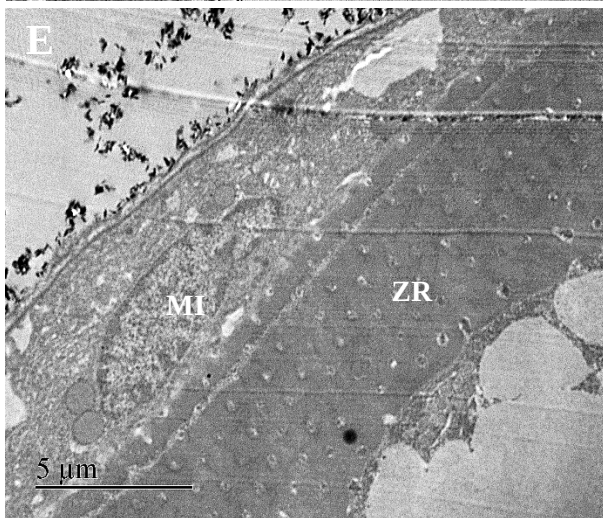
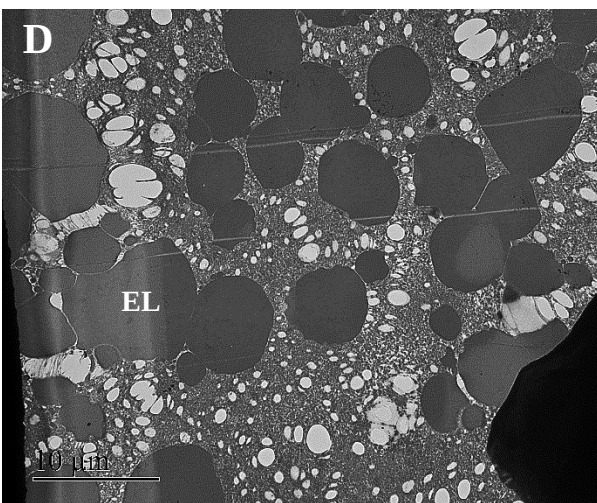
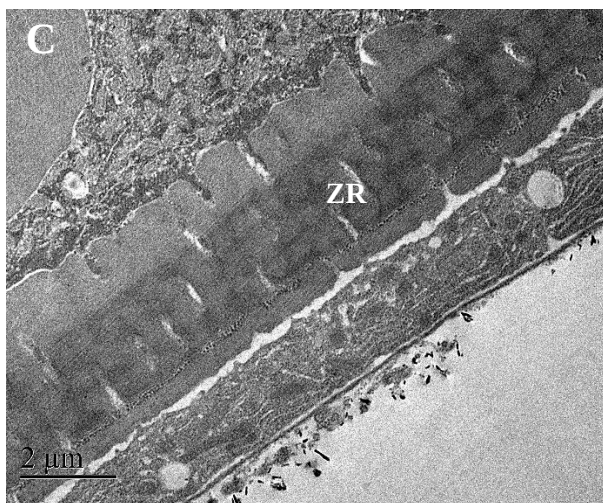
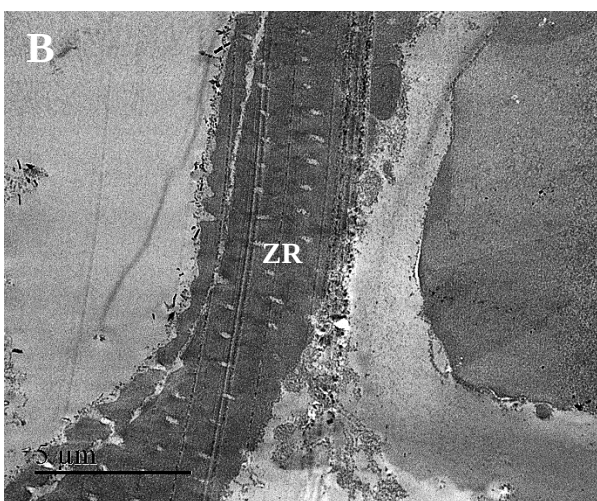
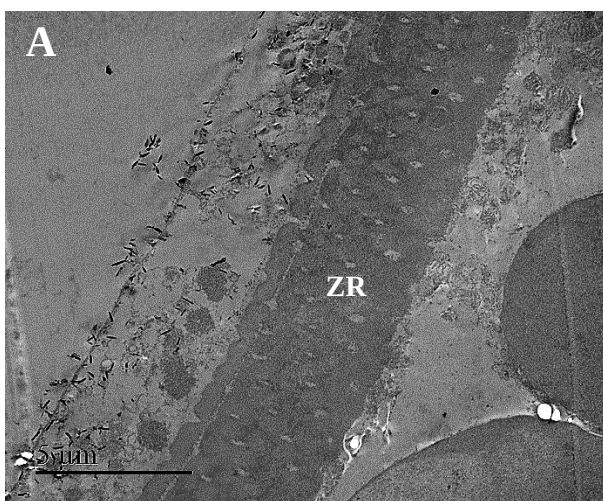
De forma semelhante, nos ovócitos tratados com 5000 ng de PGF2α/mL (Figura 2E e 2H) e 1 µg de DHP/mL (Figura 2F) a MEV mostrou ruptura da camada folicular e exposição do córion, indicando ovócitos em estágio avançado de maturação. A MET complementou essa análise ao revelar uma ZR com poros bem definidos (Figura 3A e 3B), evidenciando aumento na permeabilidade da membrana vitelínica. A ZR — também conhecida como envelope vitelínico devido ao seu padrão de organização em feixes radiais, formado por proteínas do domínio ZP, que conferem resistência mecânica e seletividade durante a fertilização (WASSARMAN; LIU, 2018) — apresentou modificações estruturais que são indicativas da maturação final. A formação de poros na ZR é um evento bem documentado, estando relacionada ao aumento da permeabilidade, essencial tanto para os processos de digestão da camada folicular quanto para a posterior fertilização (WASSARMAN; LIU, 2018; TYLER; SUMPTER, 1996; NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008). Esse padrão estrutural confirma a eficácia da PGF2α, em altas concentrações, na indução dos eventos celulares associados tanto à maturação final quanto à ovulação (HAGIWARA et al., 2020; TAKAHASHI et al., 2013).

Por outro lado, o tratamento com 500ng de PGF2α/mL apresentou discrepâncias importantes entre as análises realizadas pelas duas técnicas. A MEV revelou uma superfície folicular aparentemente íntegra, sem sinais de ruptura, enquanto a MET demonstrou uma ZR lisa, sem os poros característicos dos ovócitos em maturação avançada (Figura 3C). Esses achados indicam que, apesar de algumas alterações externas, os ovócitos não atingiram completamente o estágio final da maturação, permanecendo em uma fase intermediária, sem ocorrência de eventos como a ruptura da vesícula germinativa e a reorganização da zona radiata (WALLACE; SELMAN, 1981; TYLER; SUMPTER, 1996; NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008). Já no grupo controle (Figura 3D), a ZR manteve-se estruturalmente intacta e eletrodenso (EL), caracterizando ovócitos ainda imaturos, uma vez que a ausência de poros na zona radiata, a integridade da camada folicular e o aspecto eletrodenso são características típicas de ovócitos que permanecem na fase vitelogênica final, sem retomada da meiose (WALLACE; SELMAN, 1981; NAGAHAMA, 1994; TYLER; SUMPTER, 1996).

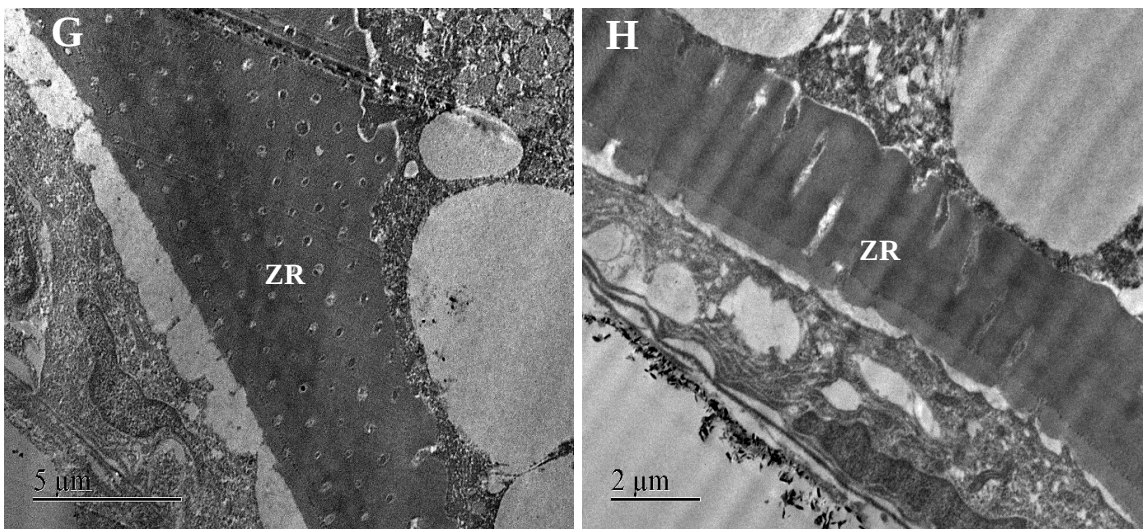
Já no tratamento de 1 $\mu$ g DHP/mL+5000ng PGF2 $\alpha$ /mL (Figura 3E) revelou uma ZR com poros evidentes e uma mitocôndria (MI), sugerindo que a associação dos hormônios potencializou a resposta de maturação. Por outro lado, no tratamento 50ng PGF2 $\alpha$ /mL (Figura 3F), a ZR apresentou-se semelhante ao controle, indicando que essa dose não foi suficiente para induzir modificações estruturais significativas.

No tratamento com 1 $\mu$ g DHP/mL, foram observadas variações estruturais dentro do mesmo grupo experimental. Enquanto na (Figura 3G) a ZR apresentava poros bem evidentes, já na (Figura 3H) ela se mostrou mais lisa, sem perfurações. Isso sugere que pode ocorrer diferenças individuais na resposta dos ovócitos a indução hormonal, associadas a diferenças fisiológicas entre as réplicas.









**Figura 3.** Análise *in vitro* de folículos ovarianos de *Astyanax altiparanae*. Micrografias obtidas por MET (A, B, C, D, E, F, G, H) de folículos ovarianos submetidos a distintos tratamentos: A, B: 5000ng PGF2 $\alpha$ /mL. C: 500ng PGF2 $\alpha$ /mL. D: Controle. E: 1 $\mu$ g DHP/mL+5000ng PGF2 $\alpha$ /mL. F: 50ng PGF2 $\alpha$ /mL. G, H: 1 $\mu$ g DHP/mL. EL: eletrodense; MI: mitocôndria; ZR: zona radiata. Barra de escala: (A, B, E, G) 5 $\mu$ m. (C, H) 2 $\mu$ m. (D, F) 10 $\mu$ m.

A comparação entre MEV e MET permitiu compreender de maneira abrangente os efeitos dos hormônios DHP e PGF2 $\alpha$  sobre a maturação ovocitária de *A. altiparanae*. As alterações observadas na zona radiata, na camada folicular e na formação ou abertura da micrópila são consistentes com os processos fisiológicos descritos para a maturação final e ovulação em teleósteos (JALABERT et al., 1977; HAGIWARA et al., 2020; TAKAHASHI et al., 2013). Esses resultados confirmam que tanto o DHP quanto a PGF2 $\alpha$ , especialmente em concentrações mais elevadas, são capazes de promover alterações estruturais compatíveis com a retomada da meiose e o preparo para a ovulação, enquanto a ausência de estímulo ou doses mais baixas resultam na manutenção dos ovócitos em estágio imaturo. Além disso, os dados reforçam achados já descritos na literatura, como no estudo de Joy e Singh (2013), que evidenciaram a capacidade da PGF2 $\alpha$  em induzir GVBD e ovulação *in vitro* na espécie *Heteropneustes fossilis*, sugerindo que, sob determinadas condições, essa prostaglandina pode atuar de maneira independente dos esteroides maturacionais tradicionais, como o DHP.

## 6. CONCLUSÃO:

Os resultados deste estudo demonstraram que as análises ultraestruturais realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) foram fundamentais para corroborar os dados obtidos previamente na avaliação do líquido de Serra, permitindo confirmar, com técnicas de maior resolução, o real estágio dos ovócitos submetidos aos diferentes tratamentos hormonais. Dessa forma, foi possível avaliar de maneira detalhada as características morfológicas associadas à maturação final e à ovulação dos ovócitos de *Astyanax altiparanae* em condições *in vitro*, atendendo plenamente ao objetivo proposto.

Os achados ultraestruturais reforçam, ainda, a hipótese de que a  $\text{PGF2}\alpha$  pode exercer um papel direto na indução da maturação final e da ovulação, de forma independente do DHP, desde que em dosagens adequadas. Diante desses resultados, este trabalho oferece uma contribuição relevante para o desenvolvimento de protocolos de reprodução induzida e para o avanço das biotecnologias reprodutivas aplicadas à espécie *A. altiparanae*. As evidências obtidas indicam que a utilização de  $\text{PGF2}\alpha$ , isoladamente ou em associação com DHP, pode ser uma estratégia eficiente para promover a maturação final dos ovócitos, representando uma alternativa promissora para a reprodução controlada em sistemas de cultivo. Para consolidar essas estratégias, futuros estudos deverão abordar a influência do tempo de exposição hormonal, a interação com outros compostos indutores e, sobretudo, avaliar a viabilidade e o potencial de fertilização dos ovócitos submetidos à maturação *in vitro*, visando ampliar as ferramentas disponíveis para o manejo reprodutivo sustentável dessa espécie.

## 7. RESUMO

A aquicultura só é possível graças aos métodos de produção de formas jovens em cativeiro. Para as espécies nativas, que representam cerca de 30% da produção piscícola nacional, a hipofisação (método mais usado) apresenta muitas falhas e o uso de produtos sintéticos está longe de ser uma realidade nos empreendimentos que produzem alevinos. As razões para estas falhas estão em início de elucidação e uma forma de avançar neste tema seria o desenvolvimento de estudos *in vitro* isolando variáveis e usando os mesmos indutores hormonais usados *in vivo*. Neste contexto, desenvolvemos anteriormente um experimento para avaliar o efeito de duas substâncias potentes indutoras de ovulação: o 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) e a prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ). Observamos que todos os tratamentos que incluíam 1 $\mu$ g DHP mL com ou sem associação com distintas doses de PGF2 $\alpha$  apresentaram ovulação bem-sucedida; mas de forma surpreendente, o tratamento com 5000ng PGF2 $\alpha$  mL foi capaz de induzir a ovulação independentemente do uso de DHP. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar histologicamente e por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) as características dos ovócitos de cada tratamento. Neste experimento, foram utilizados fragmentos de ovário de cinco fêmeas maduras e tratadas com diferentes doses de DHP e PGF2 $\alpha$  em meio de cultura Leibovitz L-15. Todos os grupos, incluindo os controles, receberam a 1ª dose convencional *in vivo de* extrato bruto de hipófise de carpa EBHC (0.6 mg. Kg<sup>-1</sup>EBHC) e os folículos ovarianos foram processados para análise histológica, MEV e MET. As observações por histologia, MEV e MET confirmaram os achados obtidos por análise em líquido de Serra e permitiram conclusões mais aprofundadas. Nos tratamentos que envolveram o uso de DHP, os ovócitos eram predominantemente do tipo GVBD, com vesícula germinativa migrada e rompida, o mesmo sendo observado no tratamento que envolveu 5000ng PGF2 $\alpha$  mL. O presente estudo confirmou a eficiência dos tratamentos com DHP associado com distintas doses de PGF2 $\alpha$  mL ou 5000ng PGF2 $\alpha$  mL foram capazes de induzir a maturação final e ovulação em folículos de *a. altiparanae*. Enquanto os controles e as doses de PGF2 $\alpha$  mL inferiores a 500ng mL foram incapazes de induzir estes processos

Palavras-chave: *in vitro*; reprodução; reprodução induzida; sustentabilidade; lambari

## 8. ABSTRACT

Aquaculture is only possible thanks to methods for producing juvenile forms in captivity. For native species, which account for about 30% of national fish production, hypophysation (the most widely used method) presents many failures, and the use of synthetic products is still far from becoming a reality in hatchery enterprises. The reasons for these failures are just beginning to be elucidated, and one way to advance this topic would be through *in vitro* studies that isolate variables and use the same hormonal inducers applied *in vivo*. In this context, we previously developed an experiment to evaluate the effect of two potent ovulation-inducing substances:  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) and prostaglandin  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ). We observed that all treatments including  $1\ \mu\text{g}$  DHP/mL, with or without association with different doses of  $PGF2\alpha$ , showed successful ovulation; however, surprisingly, the treatment with  $5000\ \text{ng}$   $PGF2\alpha$ /mL was able to induce ovulation independently of DHP. Thus, the objective of this study was to evaluate histologically and through scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) the characteristics of oocytes from each treatment. In this experiment, ovarian fragments from five mature females were treated with different doses of DHP and  $PGF2\alpha$  in Leibovitz L-15 culture medium. All groups, including controls, received the first conventional *in vivo* dose of crude carp pituitary extract (CPE) ( $0.6\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  CPE), and ovarian follicles were processed for histological, SEM, and TEM analyses. Observations by histology, SEM, and TEM confirmed the findings obtained through Serra's fluid analysis and provided more in-depth conclusions. In treatments involving DHP, oocytes were predominantly of the GVBD type, with migrated and broken germinal vesicles, the same being observed in the treatment with  $5000\ \text{ng}$   $PGF2\alpha$ /mL. This study confirmed the effectiveness of treatments with DHP associated with different doses of  $PGF2\alpha$  or  $5000\ \text{ng}$   $PGF2\alpha$ /mL in inducing final maturation and ovulation in *a. altiparanae* follicles, while controls and  $PGF2\alpha$  doses below  $500\ \text{ng/mL}$  were unable to induce these processes.

Keywords: *in vitro*; induced reproduction; reproduction induced; sustainability; lambari



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. 3. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2013.

BAZZOLI, N.; RIZZO, E. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 4, p. 399-410, 1990.

BEGOVAR, P. C.; WALLACE, R. A. Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*. *Journal of Morphology*, v. 197, p. 353-369, 1988.

BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, v. 165, p. 535-548, 2010

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. Manual de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco). Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações – CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca, 143 p., 1988.

CAI, J.; YAN, X.; LEUNG, P. Benchmarking species diversification in global aquaculture. 605th ed. Rome: FAO, 2022.

CEMIG/CETEC - Companhia energética de minas gerais, fundação centro tecnológico de minas gerais. Guia ilustrativo de peixes do rio Grande. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 144 p., 2000.

CRESPO, D.; PRAMANICK, K.; GOETZ, F. W.; PLANAS, J. V. Luteinizing hormone stimulation of in vitro ovulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) involves follicle contraction and activation of proteolytic genes. *General and Comparative Endocrinology*, v. 188, p. 175-182, 2013.

DE CASTRO, L. A. S. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura. 2002.

FARINA, M. Fundamentos de microscopia analítica para biólogos. In: SOUZA, W. (org.). Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

FUJIMORI, C.; OGIWARA, K.; HAGIWARA, A.; RAJAPAKSE, S.; KIMURA, A.; TAKAHASHI, T. Expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin receptor EP4b mRNA in the ovary of the medaka fish, *Oryzias latipes*: possible involvement in ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 332, n. 1-2, p. 67-77, 2011.

GALLETI, S. R. Introdução à microscopia eletrônica. *Biológico*, v. 65, p. 33-35, 2003.

GORDON, I. Oocyte recovery and maturation. In: Laboratory Production of Cattle Embryos. Cab International. Wallingford. Oxon. UK., p. 30-142, 1994.

GRIER, H. J. Ovarian epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei, Centropomidae). *Journal of Morphology*, v. 243, p. 265-281, 2000.

GRIER, H. J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. *Proceedings of the 53 Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 2002.

GRIMSTONE, A. V. O microscópio eletrônico em biologia. Tradução de Marina Silveira. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, Coleção Temas de Biologia, v. 11, 1980.

JALABERT, B.; BRETON, B.; BRZUSKA, E.; FOSTIER, A.; WIENIAWSKI, J. A new tool for induced spawning: the use of 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogesterone to spawn carp at low temperature. *Aquaculture*, v. 10, n. 4, p. 353-364, 1977.

JALABERT, B.; SZÖLLÖSI, D. In vitro ovulation of trout oocytes: effect of prostaglandins on smooth muscle-like cells of the theca. *Prostaglandins*, v. 9, n. 5, p. 765-778, 1975.

JOY, K. P.; SINGH, V. Functional interactions between vasotocin and prostaglandins during final oocyte maturation and ovulation in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 186, p. 126-135, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.02.043>.

KITAJIMA, E. W. Curso introdutório de microscopia eletrônica de transmissão. Piracicaba: ESALQ, 43 p., 1998.

LEVAVI-SIVAN, B.; BOGERD, J.; MAÑANÓS, E. L.; GÓMEZ, A.; LAREYRE, J. J. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, v. 165, p. 412-437, 2010.

MEHDI, Y.; EHSAN, S. E. A review of the control of reproduction and hormonal manipulations in finfish species. *African Journal of Agricultural Research*, v. 6, p. 1643-1650, 2011.

MIGAUD, H. et al. Gamete quality and broodstock management in temperate fish. *Reviews in Aquaculture*, v. 5, p. S194-S223, 2013

NAGAHAMA, Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology*, v. 38, n. 2, p. 217-229, 1994.

NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA, M. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development Growth and Differentiation*, v. 50, p. 195-219, 2008.

PEIXE-BR. Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário 2020 Peixe BR da Piscicultura. 2020.

PEIXE-BR. Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário 2021 Peixe BR da Piscicultura. 2021.

PEIXE-BR. Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário 2022 Peixe BR da Piscicultura. 2022.

PEIXE-BR. Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário 2022 Peixe BR da Piscicultura. 2023.

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

SABBAG, O. J.; TAKAHASHI, L. S.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; ARANHA, A. S. Custos e viabilidade econômica da produção de lambari-do-rabo-amarelo em Monte Castelo/SP: Um estudo de caso. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 37, n. 3, p. 307-315, 2011.

TAKAHASHI, A.; KANDA, S.; ABE, T.; OKA, Y. Evolution of the hypothalamic pituitary-gonadal axis regulation in vertebrates revealed by knockout medaka. *Endocrinology*, v. 157, p. 3994-4002, 2016.

TAKAHASHI, T. et al. Prostaglandins and membrane progesterin receptor mediate progesterin-induced ovulation in vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 34, p. 14682-14687, 2013

TANG, H.; LIU, Y.; LI, J.; LI, G.; CHEN, Y.; YIN, Y.; CHENG, C. H. LH signaling induced ptgs2a expression is required for ovulation in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 447, p. 125-133, 2017.

TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 6, p. 287-318, 1996.

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

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, v. 10, n. 2, p. 351-369, 2018.

VAZZOLER, A. E. A. M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EDUEM, 1996.

WALLACE, R. A.; SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologist*, v. 41, p. 199-222, 1981.

WASSARMAN, P. M.; LIU, C. Laying foundations for fertilization: ZP domain proteins in the mouse egg coat. *Biology of Reproduction*, v. 99, n. 2, p. 265-276, 2018. <https://doi.org/10.1093/biolre/iroy049>

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. Testosterone stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Biology of Reproduction*, v. 75, p. 924-932, 2006.

YARON, Z.; LEVAVI-SIVAN, B. Endocrine regulation of fish reproduction. In: *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. San Diego: Academic Press, v. 2, p.1500-1508, 2011.