

**Universidade Federal do Rio Grande - FURG**

**Programa de Pós-Graduação em Aquicultura**

**Reprodução induzida e criopreservação do sêmen de papa-terra**

***Menticirrhus americanus* (Perciformes: Sciaenidae)**

**CINTIA LABUSSIÈRE NAKAYAMA**

Tese apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de doutor em Aquicultura no  
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da  
Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Berteaux Robaldo

Co-orientador: Prof. Dr. Luís André Sampaio

Rio Grande

Outubro 2011

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	v
RESUMO GERAL.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
<i>Menticirrhus americanus</i> .....	3
OBJETIVO .....	26
CAPÍTULO 1 .....	27
Desenvolvimento ovocitário de <i>Menticirrhus americanus</i> sob indução com gonadotrofina coriônica humana (hCG).....	27
RESUMO .....	27
INTRODUÇÃO .....	29
MATERIAL E MÉTODOS .....	30
RESULTADOS.....	33
DISCUSSÃO.....	39
REFERÊNCIAS .....	43
CAPÍTULO 2.....	46
Reprodução induzida do papa-terra <i>Menticirrhus americanus</i> (Pisces: Sciaenidae) utilizando hCG.....	46
INTRODUÇÃO .....	47
MATERIAL E MÉTODOS .....	48
RESULTADOS.....	51
DISCUSSÃO.....	51
CAPÍTULO 3.....	57
Induction of final oocyte maturation and artificial fertilization of Southern Kingfish <i>Menticirrhus americanus</i> using different dosages of hCG.....	57
INTRODUCTION.....	58
MATERIALS AND METHODS .....	59
RESULTS.....	61
DISCUSSION .....	62

CAPÍTULO 4.....	69
Caracterização, resfriamento e criopreservação em DMSO do sêmen de papa-terra <i>Menticirrhus americanus</i> .....	69
INTRODUÇÃO .....	70
MATERIAL E MÉTODOS .....	72
RESULTADOS .....	77
DISCUSSÃO.....	80
DISCUSSÃO GERAL .....	86

**Dedico essa tese ao meu pai Takeshi Nakayama,  
aos meus irmãos Tatiana e Miguel  
e meu namorado Tiago Krauzer**

## **AGRADECIMENTOS**

Àquele que tudo criou.

A meu pai que sempre me apoiou.

A minha família pelo apoio, carinho e compreensão pela distância e saudade.

Aos professores Dr. Ricardo Robaldo e Dr. Luís André Sampaio pela orientação durante toda a tese, paciência, ensinamentos e todo o suporte para execução dos experimentos.

Aos Professores Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira e Dr. Luis Romano pela presença na banca e contribuições.

Ao professor Dr. Luis Romano pelos processamentos e análises histológicas realizados no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (FURG).

À professora Dra. Virgínia Tavano do Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos (IO - FURG) por disponibilizar o microscópio para captura das imagens das lâminas histológicas.

À professora Dra. Denise Bongalhardo (UFPel) pelas análises de integridade de membrana realizadas no Laboratório de Biotécnicas da Reprodução de Aves (UFPel) e orientação das análises.

Aos peixes utilizados nos experimentos.

Aos pescadores Henrique, seu Francisco, seu Jorge, Bira, e aos amigos-pescadores Adriano e Faiston.

Aos colegas de EMA que direta ou indiretamente participaram dos trabalhos.

Aos funcionários e à coordenação do programa de pós-graduação em aquicultura.

Ao suporte financeiro pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Aos amigos da piscicultura Marcelo Okamoto, Ricardo, Shei, Eduardo, Janaína e Gabriel pela ajuda e amizade.

A Marta, Dani, Adriana e Emeline pela ajuda nas técnicas dos procedimentos histológicos.

Aos amigos do Larus Renato, Cris e Neve pelo apoio, amizade e ajuda na caminhada da vida.

A família Krauzer sempre tão amada e querida.

Ao Tiago pela paciência, dedicação e companheirismo.

## RESUMO GERAL

O papa-terra *Menticirrhus americanus* é um Sciaenidae com ampla distribuição na costa oeste do Atlântico, da Argentina aos E.U.A. Frente a seu potencial para aquicultura os objetivos do presente estudo foram a reprodução em cativeiro e a criopreservação do sêmen de *M. americanus*. Para a indução a maturação final e produção de ovos o estudo testou a efetividade da gonadotropina coriônica humana (hCG), acompanhando por meio da histologia os efeitos no desenvolvimento e a maturação dos ovócitos. Nos machos foi testada a qualidade espermática após resfriamento e criopreservação do sêmen em dimetil sulfoxido (DMSO). O desenvolvimento dos ovócitos foi classificado em pré-vitelogênese, vitelogênese e de maturação. No papa-terra o início da vitelogênese é marcado pela formação de glóbulos lipídicos e alvéolos corticais na periferia do ovoplasma. A vitelogênese protéica é caracterizada pela formação de grânulos de vitelo e coalescência dos glóbulos de lipídios. A coalescência do vitelo formando uma massa única, concomitantemente a hidratação dos ovócitos marcam o final da maturação. Fêmeas induzidas (300 UI hCG.kg<sup>-1</sup>) apresentaram 60% de sucesso nas desovas, com período de latência de 38,1 ± 3,4h. Os ovos mediram 730 ± 0,06 µm de diâmetro, com taxas de fertilização e eclosão de 63,8 ± 14,5 e 43,3 ± 10,7%, respectivamente. A fecundidade relativa foi estimada entre 40.080 e 294.000 ovos.kg<sup>-1</sup>. Em dosagens de 300, 600 e 900 UI de hCG.kg<sup>-1</sup> o sucesso nas desovas foi de 45, 60 e 41 %, respectivamente. As três dosagens induziram a maturação final dos ovócitos, mas o melhor desempenho reprodutivo foi em 600 UI hCG.kg<sup>-1</sup> com maior taxa de fertilização (73%) e maior produção estimada de larvas (39.000/desova). O sêmen apresentou osmolalidade de 370 mOsm.kg<sup>-1</sup>, espermatócrito de 88%, pH 6,9 e densidade de 9,9 x 10<sup>9</sup> espermatozóides.mL<sup>-1</sup>. A motilidade espermática foi ativada a partir de 300 mOsm.kg<sup>-1</sup>. Os testes de motilidade, após refrigeração (5°C) foram realizados em intervalos de 3 h e demonstraram que o sêmen extrusado mantém a qualidade por 15 h, porém se mantido no testículo este período é de 6 h. Nos testes de criopreservação, as concentrações de DMSO 5, 10 e 20% não prejudicaram a motilidade espermática, nem a integridade de membrana pós-descongelamento, indicando DMSO 5% para a criopreservação do sêmen. Em suma, os resultados deste estudo permitiram delinear protocolos eficientes para maturação final dos ovócitos e criopreservação do sêmen, comprovando, pela primeira vez, a possibilidade da reprodução de *Menticirrhus americanus* em cativeiro. Ao mesmo tempo, os dados aqui apresentados deverão servir como base inicial para estudos futuros necessários a otimização da produção de larvas desta espécie.

## ABSTRACT

The *Menticirruhs americanus* is a sciaenid widely distributed along the Atlantic west coast from Argentina to the USA. As potential specie to aquaculture the objectives of the present study were the reproduction in captivity and cryopreservation of *M. americanus* semen. To final oocyte maturation and egg production the study tested the human corionic gonadotropin (hCG) in different dosages, and its effects in final maturation with histological description of the oocytes development and events related. The spermatic quality test was used to evaluate the effectiveness for refrigerated storage and cryopreservation with dimethyl sulfoxide (DMSO). The oocytes development was classified as pre-vitellogenic, vitellogenic and in maturation. At the early lipid vitellogenesis is pronounced by lipid globules and cortical alveolus. Yolk vitellogenesis is characterized by appearance of yolk granule, lipid vesicles and yolk granules coalescence. The yolk coalescence became a unique yolk mass that resulting in hydration and at the end of the maturation. Females induced with hCG (300 IU .kg<sup>-1</sup>) presented spawning success in 60%, the latency period was 38.1 ± 3.4h. Eggs diameter was 730 ± 0.06 µm, fertilization and hatching rate were 63.8 ± 14.5% e 43.3 ± 10.7%, respectively. The relative fertility was estimated ranged from 40.080 to 294.000 eggs.kg<sup>-1</sup> eggs.kg<sup>-1</sup>. The dosages 300, 600 and 900 IU hCG.kg<sup>-1</sup> to the spawning success was 45, 60 and 41%, respectively. And all of these dosages were effectiveness in the final maturation, but the best reproductive performance, fertilization rate (73%) and larvae production (39,000/spawning), was found in 600 IU hCG.kg<sup>-1</sup>. Semen presented osmolality 370 mOsm.kg<sup>-1</sup>, spermatocrit 88%, pH 6.9 and density 9.9 x 10<sup>9</sup> spermatozoa.mL<sup>-1</sup>. Motility was activated from 300 mOsm.kg<sup>-1</sup>. The motility test after cold storage (5°C), every 3 h, showed extruded semen retained motility for 15 and semen from testis for 6h. Semen cryopreserved with 5, 10 and 20% dimethyl sulphoxide (DMSO) post-thaw sustained the same spermatic quality and membrane integrity The results point to 5% DMSO to cryopreservation *M. americanus* semen. In conclusion, the results allowed to develop efficient protocols to induce of final maturation and semen cryopreservation, performing for the first time the viability of the *M. americanus* reproduction in captivity.

## INTRODUÇÃO GERAL

### *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758)

A família Sciaenidae possui 70 gêneros e 270 espécies, das quais seis gêneros e 28 espécies são de águas continentais (Nelson, 2006).

Para a aquicultura as principais espécies são *Larimichthys croceus*, *Sciaenops ocellatus* e *Argyrosomus regius*, com produção estimada em 117.000 toneladas (FAO, 2005).

Pertencente a essa família está o gênero *Menticirrhus* com nove espécies e apenas o *Menticirrhus littoralis* e *Menticirrhus americanus* são encontrados no Brasil (Castillo, 1986). A distribuição dessas espécies se dá ao longo da costa oeste do Oceano Atlântico (Braun e Fontoura, 2004). Sendo que *M. americanus* (Fig.1) é encontrado entre Cape Cod, nos E.U.A. até a Buenos Aires, na Argentina (Menezes e Figueiredo, 1980).

Os nomes comuns utilizados no Brasil para os *Menticirrhus* são papa-terra, betara, perna-de-moça, entre outros. Tanto no Brasil como nos E.U.A. o papa-terra é apreciado na prática da pesca esportiva e pelo sabor de sua carne (Smith e Wenner, 1985, Robin e Ray, 1986, Braun e Fontoura, 2004).

O papa-terra é uma espécie eurialina, com hábito alimentar carnívoro e bentófago podendo ser considerado oportunista devido a sua dieta variada à base de crustáceos, peixes e poliquetas (Haluch, 2011). Os maiores tamanhos registrados são por volta de 45 cm (Muniz e Chaves, 2008). O comprimento médio ( $L_{50}$ ) mínimo de primeira maturação gonadal é estimado em 16,7 e 15,4 cm para fêmeas e machos, respectivamente, e o comprimento em que 100% se encontram aptos a reprodução é 22,8 e 21,3 cm para fêmeas e machos, respectivamente (Haluch et al., 2011).





Figura 1: Exemplar adulto de papa-terra *Menticirrhus americanus*. Barra = 2 cm.

Os estudos disponíveis sobre *M. americanus* abordam a distribuição da espécie (Menezes e Figueiredo, 1980), biologia e ciclo de vida (Castillo, 1986), variação ontogênica do hábito alimentar (Haluch et al., 2009), desenvolvimento ovocitário (Chaves, 1989), abundância sazonal de captura por pesca recreativa (Lewis et al, 1999), estrutura populacional e biologia reprodutiva (Haluch et al., 2011).

O período reprodutivo varia conforme a região e no sul do Brasil compreende as estações da primavera, verão e outono (Haluch et al., 2011). Na primavera é registrada a maior frequência de animais maduros, com os maiores índices gonadossomáticos e o verão e início de outono a maior frequência de fêmeas desovadas.

O desenvolvimento ovocitário de *M. americanus* foi classificado como sincrônico em mais de dois grupos, com desovas parceladas durante o período reprodutivo (Chaves, 1989). Com fecundidade relativa estimada, variando de 32.600-241.000 ovos.kg<sup>-1</sup> (Castillo, 1986). Esses dados são provenientes da pesca e ajudam a compreender a biologia da espécie, aportando informações que podem ser utilizadas ainda para a produção em cativeiro.

## **Desenvolvimento ovocitário**

A produção de peixes marinhos e estuarinos no Brasil ainda é inexpressível. Para que a atividade se consolide no país é preciso que ocorra o fechamento do ciclo em cativeiro e domínio do pacote tecnológico das espécies eleitas. As pesquisas sobre reprodução, nutrição, patologias e bem-estar, entre outros são essenciais na escolha de quais espécies apresentam características que se ajustam a produção em cativeiro.

Desde a década de 90 até os dias atuais a produção animal vem passando por mudanças em seu conceito e buscando cada vez mais uma condição de sustentabilidade. Valenti (2008) discute o termo sustentabilidade na aquicultura e reconhece que para esse tema não existe uma definição única e correta. Mas que o princípio do tema envolve diversas esferas: a econômica, política, social, ecológica e suas interrelações. O interrelacionamento das diferentes esferas é o que pode garantir a produtividade por gerações, tornando a atividade sustentável.

Uma das condições de sustentabilidade é o fechamento do ciclo de vida da espécie em cativeiro evitando a captura das formas juvenis no ambiente. Além disso, a reprodução em cativeiro permite estabelecer linhas de pesquisa em seleção, melhoramento genético, qualidade de gametas, embriões, larvas e juvenis, bem como sobre a reposição dos estoques e das espécies ameaçadas de extinção (Mylonas et al., 2010).

O manejo reprodutivo exige conhecimentos prévios como o período reprodutivo, as formas e as estratégias de maturação dos ovócitos e desova. O ideal é que somente após esses conhecimentos se tente estabelecer a melhor forma de manejo em cativeiro (Grau et al., 1996).

Uma das possíveis linhas de estudo a se estabelecer em reprodução é a análise das gônadas. Os métodos aplicados no estudo do desenvolvimento das gônadas foram revisados por West (1990). O autor descreve algumas formas mais precisas de análise como cortes

histológicos, biópsia por meio de canulação e outros métodos menos precisos como índice gonadossomático e análise macroscópica de coloração das gônadas. A escolha do melhor método para avaliação depende do propósito do trabalho, disposição de material para processamento e aplicabilidade (teórica/prática).

Durante a fase de maturação das gônadas, algumas espécies em cativeiro, iniciam o processo de vitelogênese, mas não conseguem alcançar a maturação final dos ovócitos que por sua vez entram em processo de atresia e reabsorção (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007, Zohar e Mylonas , 2001). A ausência de maturação final, bem como patologias e ou disfunções por contaminantes são acompanhadas por meio da histologia como método de análise (Blazer et al., 2002). O estudo histológico pode mostrar ou possibilitar o entendimento de parte do problema relacionado ao impedimento de maturação final e desova em cativeiro. Esse método permite acompanhar e analisar os eventos envolvendo o desenvolvimento dos ovócitos e inferir a respeito da qualidade dos gametas e ou da fertilização (Lubzens et al., 2010). Para melhor compreensão dos eventos envolvidos no desenvolvimento dos ovócitos é importante conhecer o processo de gametogênese.

O processo da gametogênese nas fêmeas é denominado ovogênese ou oogênese. A formação das gônadas se inicia com a migração das células germinativas primordiais para o estroma, quando os animais ainda são juvenis.

Embora o sexo (macho ou fêmea) seja determinado pelos cromossomos sexuais, a resposta aos efeitos dos hormônios liberados pela hipófise (gonadotrofinas) é que determinará se os gametas serão oogônias ou espermatogônias. Nas fêmeas, após a diferenciação e sob efeito hormonal as células germinativas primordiais se transformam em oogônias. As oogônias passarão por divisão mitótica, proliferando-se e permanecendo nesse estágio até que o gatilho

para o período reprodutivo seja ativado. Porém, antes de se tornarem ovócitos maduros as oogônias passam por uma série de transformações morfo-fisiológicas.

Em termos práticos alguns autores dividem o desenvolvimento ovocitário em duas fases: pré-vitelogênica e vitelogênica (Patiño e Sullivan, 2002). Sendo a pré-vitelogênica subdividida em fases de oogônia, ovócito primário e ovócito secundário. Enquanto a fase vitelogênica corresponde à incorporação, principalmente de vitelogenina (fosfolipoglicoproteína). Essa fase pode ainda ser subdivida em inicial e final.

Após a proliferação, as oogônias sofrem duas divisões meióticas, sendo a primeira denominada de crescimento/equacional e a segunda meiose de fase de maturação. O primeiro evento será divisão meiótica I, as oogônias se transformam em ovócitos primários. As oogônias são encontradas em ninhos e ao se transformarem em ovócitos primários são envolvidos individualmente por uma primeira camada de células achatadas denominada de granulosa e outra externa denominada de teca. O conjunto formado pelo ovócito e mais essas camadas de células que envolvem o ovócito é denominado de folículo.

Os ovócitos primários passam por mudança morfológica e a alteração mais marcante nessa fase é o aumento em tamanho do citoplasma (basófilo), a presença marcante do núcleo com vários nucléolos (ou um único nucléolo, dependendo da espécie), essa fase é denominada de cromatina nucleolar.

A transformação de ovócito primário em ovócito secundário ocorre ainda durante a meiose I. Mesmo em meiose I estacionária o ovócito secundário continua o seu desenvolvimento, crescendo ainda em tamanho.

O citoplasma do ovócito secundário é maior que no estágio anterior, núcleo se torna menos basófilo e os nucléolos estão menores e periféricos, ocorrendo crescimento das camadas

das células foliculares (granulosa e tecal). Finalizando a fase de ovócito secundário inicia-se o processo de vitelogênese marcando ainda o início da meiose II (maturação).

Embora o processo de vitelogênese se refira à incorporação da vitelogenina no ovócito, outras substâncias como hormônios, proteína coriogenina, vitaminas e lipídios são incorporadas (Brooks et al., 1997, Mileva et al., 2011). Na vitelogênese as mudanças morfológicas são bem marcantes como a formação de alvéolos corticais, glóbulos de lipídios, grânulos de vitelo e coalescência dos glóbulos e grânulos de vitelo.

West (1990) dividiu o processo de vitelogênese em inicial e final. Já outros autores consideram as fases inicial, média e final (Micale et al., 1999, Mandich et al., 2002). A falta de padronização universal acaba gerando confusão de nomenclatura e interpretação incorreta dos resultados. Essas diferenças podem ocorrer ainda em função das particularidades de cada espécie, com fases mais ou menos marcantes.

Para estudos mais detalhados Grau et al. (1996) sugerem a divisão do processo de vitelogênese em fase endógena ou exógena/verdadeira. Isso porque esses autores compararam, entre diversas espécies, a formação dos eventos ligados a vitelogênese como alvéolos corticais, glóbulos lipídicos e grânulos de vitelo e verificaram diferentes origens na formação desses. E verificaram ainda que a ordem de ocorrência desses eventos pode variar conforme a espécie.

Os próximos passos na maturação do ovócito, após esses eventos serem formados e ou incorporados, será o aumento da coalescência das glóbulos de lipídios. Consequente, os grânulos de vitelo também se coalescem. O início da coalescência dos grânulos de vitelo corresponde ao final do processo vitelogênico. A coalescência dos glóbulos de lipídio dará origem a gota de óleo e as vitelínicas a uma massa uniforme de vitelo. Material que servirá de nutrição para

crescimento e desenvolvimento do embrião, antes da alimentação exógena (Le Menn et al., 2007).

Simultaneamente a formação da gota de óleo e do vitelo o ovócito inicia modificações para formação da zona radiata. A zona radiata é formada a partir de microvilosidades da membrana do ovócito, próximo a camada de células da granulosa. O enrijecimento da zona radiata ocorre devido a deposição de glicoproteínas e ou das proteínas denominadas coriogeninas (Le Menn et al., 2007). A zona radiata ainda denominada de zona pelúcida, zona do envelope ou córion é responsável pela formação da micrópila. Local específico de entrada do espermatozóide para a fertilização.

O processo final da maturação da célula é o processo de hidratação. A hidratação é responsável pelo aumento do volume celular, com o início marcado pela degradação da vesícula germinativa (núcleo). Além disso, os grânulos de vitelo sofrem hidrólise, resultando no aumento de peptídios, íons e aminoácidos livres (Skoblina, 2010). O gradiente osmótico formado, com aumento desses solutos (osmólitos orgânicos) faz com que a água entre na célula, hidratando o ovócito. O resultado morfológico da hidratação é o aumento de volume do ovócito, culminando com o rompimento do folículo, devido ao aumento da pressão intrafolicular (Yueh e Chang, 2000).

O rompimento das camadas celulares leva a liberação do ovócito no lúmen do ovário (cistovário) ou na cavidade abdominal (gimnovário) nas espécies semélparas. Em contato com o meio externo o ovócito está pronto para ser fertilizado.

Quando fertilizado o ovócito continua a segunda divisão meiótica finalizando o processo com a expulsão do segundo corpúsculo polar. Agora o ovócito fertilizado é chamado de ovo.

Durante o processo de fertilização o espermatozóide alcança a membrana plasmática do ovócito pelo canal da micrópila. A entrada do primeiro espermatozóide aciona a indução à reação cortical. Nesse momento o conteúdo dos alvéolos corticais é liberado no espaço perivitelínico. Devido a presença de glicoproteínas proveniente dos alvéolos corticais ocorre hidratação da micrópila, bloqueando a entrada de outros espermatozoides e impedindo a poliespermia.

### **Reprodução induzida em cativeiro**

Para algumas espécies como *Salmo salar*, *Oreochromis niloticus*, *Paralichthys orbignyanus* e *Rachycentron canadum* o pacote tecnológico que envolve o manejo reprodutivo já é efetivo (Thorpe, 1994, Coward e Bromage, 2000, Sampaio et al., 2008, Nhu et al., 2011). Embora haja domínio das técnicas de produção dessas espécies, a busca por melhores desempenhos reprodutivos é contínua. Mylonas e Zohar (2001) destacam a necessidade da continuidade nas pesquisas com reprodutores, pois não são raros os casos em que os reprodutores apresentam disfunções reprodutivas, mesmo depois de aclimatados, domesticados e tratados com hormônios exógenos.

O sucesso da reprodução em cativeiro (natural ou artificial) depende ainda dos fatores abióticos, principalmente, temperatura e fotoperíodo que em sistemas internos (*indoor*) podem ser simulados (Bromage et al., 2001).

Locais de maior latitude possuem maiores variações climáticas ao longo do ano. Em função dessa variação as espécies apresentam reprodução sazonal (Pankhurst e Portes, 2003, Mylonas et al., 2010). Fatores abióticos, como o fotoperíodo e a temperatura são estímulos ambientais que promovem uma resposta fisiológica sobre o eixo reprodutivo no crescimento e

maturação dos gametas (Bromage et al., 2001). No entanto, para espécies que não respondem apenas a esses estímulos na gametogênese é feito o uso de hormônios exógenos.

A manipulação hormonal e o manejo abiótico funcionam como um gatilho na reprodução. Quando o gatilho é acionado ocorre uma série de reações neuroendócrinas em cascata no eixo-reprodutivo, no crescimento e na maturação dos gametas.

O eixo-reprodutivo corresponde aos locais de ação dos hormônios ligados a reprodução (Fig.2). Os principais hormônios envolvidos, quando o gatilho é acionado, são os hormônios liberadores de gonadotrofina (GnRH) e os hormônios gonadotróficos: hormônio folículo estimulante (FSH ou GtHI) e hormônio luteinizante (LH ou GtHII)

Tanto os conhecimentos dos fatores ambientais envolvidos na reprodução quanto da fisiologia da reprodução permitiram o desenvolvimento de técnicas de reprodução artificial. A consequência da reprodução artificial foi o aumento na produção das formas jovens em laboratórios (Lee e Donaldson, 2001).

A manipulação hormonal na piscicultura é uma prática conhecida desde a década de 30 quando se iniciaram os primeiros tratamentos com hormônios, processo conhecido como hipofiseação (Houssay 1930, Ihering 1937). Esses estudos iniciais mudaram a forma de produção em cativeiro e embora a técnica seja antiga ela é aplicada até hoje (Mylonas e Zohar, 2001).



## Eixo reprodutivo em peixes

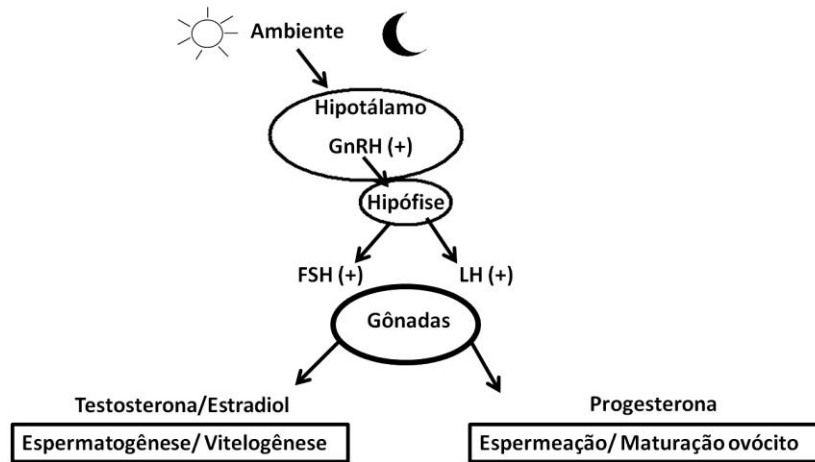


Figura 2: Esquema do efeito ambiental e as respostas endócrinas da reação em cascata do cérebro (hipotálamo e hipófise) até as gônadas, no desenvolvimento e maturação dos gametas.

A técnica da hipofiseção surgiu como uma tentativa de contornar o problema do bloqueio da desova em cativeiro. Passados 80 anos, desde o início da utilização da técnica de hipofiseção para maturação dos gametas seu uso ainda é preconizado nos dias atuais. Mas ao longo desse período surgiram outras técnicas de indução à maturação.

Mylonas e Zohar (2001) em revisão descrevem de forma cronológica o emprego desses hormônios indutores da maturação utilizados com sucesso na piscicultura. Esses autores consideram importante três diferentes momentos, primeiramente a técnica de hipofiseção (descrita anteriormente - década 30), em segundo momento a utilização do hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG) (década de 70) e a terceira fase com o uso dos agonistas dos hormônios liberadores das gonadotrofinas - GnRH (GnRHs de mamífero, salmão, galinha, seabream) e a associação desses hormônios com antagonistas da dopamina (anti-dopamínicos).

A dopamina é um neurohormônio sintetizado no hipotálamo, com ação de retroalimentação negativa (Dufour et al., 2010). A inibição provocada pela dopamina promove a

síntese de GnRH apenas em níveis basais, mas a quantidade não é suficiente para desencadear a reação em cascata para maturação dos gametas. Embora para peixes a dopamina seja inibitória na síntese de GnRH, algumas espécies (*Micropogonias undulatus* e *Sparus aurata*) parecem não sofrer este efeito (Copeland e Thoma, 1989, Zohar et al., 1995).

Em geral, esses hormônios indutores exógenos, apesar do propósito comum em promover a gametogênese e a maturação final, diferem em sua ação de acordo com seus diferentes órgãos alvo (hipotálamo, hipófise ou gônadas) (Mylonas et al., 2010).

O hCG utilizado na piscicultura é o mesmo empregado na clínica humana, podendo ser purificado a partir da urina de mulheres grávidas. O hCG é uma molécula glicoprotéica com peso molecular de 38 000 Daltons produzida na placenta. Essa molécula é dividida em duas subunidades, alfa e beta, com cadeia peptídica formada por 92 e 45 aminoácidos, respectivamente (Medeiros e Norma, 2006). Sua aplicação em peixes é mundialmente difundida devido à facilidade de compra, aplicação, padronização mundial e o mais importante sua efetividade na maturação final (Zohar e Mylonas, 2001).

O efeito prolongado de meia-vida do hCG em peixes e a sua atuação como LH explicam a eficiência dessa gonadotrofina na maturação final e desova (Khan et al., 1997, Zohar e Mylonas 2001). Embora essa eficiência seja comprovada na maturação dos ovócitos, algumas espécies apresentam resposta imune, produzindo antígenos contra o hCG, necessitando de dosagens crescentes para ação efetiva. Por outro lado em duas espécies de Cyprinidae não foi detectada a formação de anticorpos, mesmo sendo o hCG administrado terapêuticamente por vários anos (Van Der Kraak et al., 1989).

O hCG é eficaz para a indução de alguns Sciaenidae como *Argyrossomos hololepidotos*, *Micropogonias furnieri* e *Micropogonias undulatus* (Gwo et al., 1993, Battaglione e Talbot, 1994,

García-Alonso e Vizziano, 2004). Embora esses trabalhos tenham demonstrado sucesso na maturação e desova, as dosagens utilizadas variaram de 300 a 1.000 UI.kg<sup>-1</sup>.

### **Caracterização e armazenamento de sêmen**

Os estudos na reprodução durante muitos anos tiveram como foco principal as fêmeas. Fato esse explicado, principalmente, porque na maioria das espécies de peixes, os machos se encontram espermiantes pelo menos no período reprodutivo (Mylonas et al., 2003).

Nos últimos anos a necessidade por melhores resultados no desempenho reprodutivo fez com que aumentasse o número de trabalhos relacionados aos machos. Os trabalhos, em geral, possuem como objetivo a descrição da caracterização do sêmen, sua criopreservação, soluções de ativação e indução hormonal para aumento da quantidade e qualidade do sêmen (Tiersch et al., 2004, Austuriano et al., 2006, Alavi et al., 2007, Agulleiro et al., 2007).

Diferentemente de outros vertebrados, em peixes, os espermatozóides não possuem motilidade no plasma seminal (ou sêmen) enquanto estão nas gônadas. A motilidade se inicia quando os espermatozóides entram em contato com o meio aquático, sendo o choque osmótico o maior responsável por iniciar a motilidade (Alavi e Cosson, 2006, Cosson et al., 2008, Bobe e Labbé, 2010). Para peixes marinhos de fertilização externa, a motilidade dos espermatozóides é iniciada pelo aumento da osmolalidade do meio (água do mar  $\approx 1000 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ ) ou quando a osmolalidade do meio for superior a do sêmen. A ativação pode ser feita até mesmo com solução hipertônica a partir de açúcar, sem íons (Cosson et al., 2008).

O tempo que os espermatozóides permanecem ativos varia conforme a espécie podendo ser esse período de segundos até 20 minutos (Zhang, 2004). O tempo médio de motilidade (deslocamento) pode ser utilizado como um parâmetro de qualidade, assim como a porcentagem

de espermatozoides móveis (Cosson, 2004). A porcentagem de espermatozoides móveis pode variar dependendo da osmolalidade da solução ativadora, dessa forma é indicado o teste de ativação utilizando diferentes osmolalidades (Wayman et al., 1998).

Considerando o curto período de tempo de motilidade e a perda da qualidade quando ativado precocemente, é importante que alguns cuidados sejam tomados durante a coleta. Cuidados como, a higienização e secagem do poro urogenital evitam ativação e ou contaminação com urina e fezes.

Quando se trabalha com as características do sêmen, as informações geradas são importantes não apenas para determinar a osmolalidade de ativação. As características geram informações do sêmen como pH, íons, densidade (espermatozoides  $\text{ml}^{-1}$ ), espermatócrito, tempo de motilidade, pressão osmótica, entre outros. A partir dessas variáveis é possível manejar os reprodutores e verificar perda de qualidade de gametas. O sêmen de boa qualidade pode ainda ser armazenado após a avaliação, sem a necessidade do uso imediato.

O armazenamento do sêmen pode se feito pelo resfriamento podendo ser armazenado por horas ou dias em temperaturas próximas a  $5^{\circ}\text{C}$  (Tiersch et al.,2004)

Para manter o sêmen resfriado dois modos podem ser aplicados. A diluição em solução diluidora ou ainda mantido puro (Wayman et al., 1998, Mylonas et al., 2004). Se houver necessidade de se manter o sêmen por mais tempo, meses ou anos a melhor alternativa é a criopreservação.

A criopreservação é uma técnica que tem sido utilizada nos processos de seleção (Grier e Neidig, 2011). A avaliação correta da qualidade do sêmen é fundamental em programas de melhoramento, pois essas perdas podem ser irreversíveis no processo seletivo.

A criopreservação do sêmen possui ainda outras finalidades como, por exemplo, descartar a necessidade de manter os machos em cativeiro, permitir réplicas em experimentos de fertilização e qualidade dos ovócitos e troca de material genético entre os laboratórios.

A técnica de criopreservação de gametas em peixes é aplicada há mais de três décadas e seu principal uso na aquicultura é na inseminação artificial, principalmente quando os machos não estão disponíveis (Zhang, 2004).

Em peixes marinhos são relacionadas mais de 40 espécies com gametas criopreservados com sucesso (Gwo, 2011). Durante o processo de congelamento a maior dificuldade é evitar os danos provocados pela formação de cristais de gelo intra ou extracelular e ou desidratação ocasionando morte celular.

O grande avanço da criopreservação de gametas se deve a utilização de crioprotetores que minimizam esses danos (Tiersch, 2011). Mas o ponto mais importante de todo o processo de criopreservação não se limita a escolha e quantidade certa do crioprotetor, mas também na garantia de motilidade pós descongelamento (Cabrita et al., 2010).

Para que haja sucesso na técnica, é importante conhecer os eventos químicos associados ao processo de congelamento, a composição celular e o movimento de entrada ou saída de água (osmose) (Denniston et al., 2011). O valor dessas informações pode ser traduzido no uso de solução diluidora e crioprotetores e na efetividade desses.

O agente crioprotetor deve ter baixo peso molecular e alta solubilidade (Nash, 1966). O crioprotetor de alta solubilidade penetra na célula evitando excessiva desidratação, reduzindo danos provocados pelo abaixamento da temperatura. A classificação do crioprotetor pode ser em permável e não permeável a membrana, os crioprotetores permeáveis mais utilizados são dimetil

sulfóxido (DMSO), metanol, glicerol, dimetil acetamida (DMA), etileno glicol, e os impermeáveis albumina e polietileno glicol (Denniston et al., 2011).

Os principais crioprotetores utilizados na aqüicultura são (DMSO), glicerol, metanol, (DMA) e as concentrações são espécie específicas (He e Woods, 2003, Rideout et al., 2003). O DMSO, um dos mais utilizados na aqüicultura apresenta concentrações efetivas variado de 5-20% (Muchlisin, 2005). Alguns exemplos de sucesso na criopreservação de sêmen usando esse intervalo de concentração foram estudados em Sciaenidae *S. ocellatus* e *Pogonias cromis*, bem como em diversas espécies de outras famílias de peixes marinhos (Wayman et al., 1997, Wayman et al., 1998).

Devido à toxicidade de alguns crioprotetores como o DMSO, por exemplo, há necessidade do uso de soluções diluidoras (Tiersch, 2011). Essas soluções serão importantes para diluir sêmen viscoso e de pouco volume, que geralmente apresentam altas densidades de espermatozóides, facilitando assim a ação do crioprotetor (Muchlisin, 2005). Os diluidores podem ser as soluções de Ringer (Ringer modificada), Hank's (solução salina balanceada, HBSS – sigla em inglês) ou fisiológicas (a base de NaCl). A principal característica desejável da solução diluidora é que não ative os espermatozóides durante o processo de criopreservação (He e Woods, 2003). A função da solução será mimetizar o sêmen facilitando a manipulação (Ciereszko et al., 2011).

## REFERÊNCIAS

Agulleiro, M. J, Scott, A.P., Duncan, N., Mylonas, C.C., Cerdà, J., 2007. Treatment of GnRH-implanted Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with 11-ketoandrostenedione stimulates spermatogenesis and increases sperm motility. *Comp. Biochem. Physiol.* 147, 885-892.

- Alavi, S M H, M Rodina, T Policar, P Kozak, M Psenicka, and O Linhart. 2007. Semen of *Perca fluviatilis* L.: sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. *Theriogenology* 68, 276-83.
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biol. Int.* 30, 1-14.
- Austuriano, J. F., Marco-Jiménez, F., Pérez,L., Balasch, S., Garzón, D.L., Peñaranda, D.S., Vicente, J.S., Viudes-de-Castro, M.P., Jover, M., 2006. Effects of hCG as spermiation inducer on European eel semen quality. *Theriogenology* 66, 1012-1020.
- Battaglione, S.C., Talbot, R.B., 1994. Hormone induction and larval rearing of mullet, *Argyrosomus hololepidotus* (Pisces: Sciaenidae). *Aquaculture* 126, 73-81.
- Blazer, V.S. 2002. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 85-101.
- Bobe, J., Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 535-548.
- Braun A., Fontoura, N., 2004. Reproductive biology of *Menticirrhus littoralis* in southern Brazil (Actinopterygii: Perciformes: Sciaenidae). *Neotrop. Ichthyol.* 2, 31-36.
- Bromage, N., Porter, M., Randall, C., 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197, 63-98
- Brooks, S., Tyler, C., Sumpter, J., 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Rev. Fish Biol. Fisher.* 7, 387-416.
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Paramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., Herráez, M.P., 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol.* 26, 623-635.

- Castillo, V.R.A., 1986. Estudo sobre a biologia e ciclo de vida de *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) Ubatuba 23°30'S 25°5'S. Dissertação de mestrado em Oceanografia Biológica do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.
- Chaves, P., 1989. Desenvolvimento dos ovócitos em *Harengula clupeola*, *Urophycis brasiliensis*, *Eucinostomus argenteus*, *Isopisthus parvipinnis* e *Menticirrhus americanus* (Teleostei). Bol. Inst. Oceanogr. 37(2), 81-93.
- Ciereszko, A., Glogowski, J., Dabrowski, K., 2011. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Tiersch, T.R., Green, C.C. (Eds.), Cryopreservation in aquatic species. World Aquaculture Society Baton Rouge. p. 46-79.
- Copeland, P.A., Thomas, P., 1989. Control of gonadotropin release in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): evidence for lack of dopaminergic inhibition. Gen. Comp. Endocrinol. 74, 474-483.
- Cosson, J., 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. Aquacult. Int. 12, 68-95.
- Cosson, J., Groison, A.L., Suquet, M., Fauvel, C., Dreanno, C., Billard, R., 2008. Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. Reproduction 136, 277-294.
- Coward K., Bromage N.R., 2000. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. Rev. Fish Biol. Fisher. 10, 1-25.
- Denniston, R.S., Michelet, S., Bondioli, K.R., Godke, R.A., 2011. Principles of embryo cryopreservation. In: Tiersch, T.R., Green, C.C. (Eds.) Cryopreservation in Aquatic species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 274-290.
- Dufour, S., Sebert, M.E., Weltzien, F.A., Rousseau, K., Pasqualini, C., 2010. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. J. Fish Biol. 76, 129-160.



- FAO 2005: Aquaculture production: quantities 1970-2005, Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit, Fishstat Plus: Universal software for fishery statistical time series.
- García-Alonso, J., Vizziano, D., 2004. Induction of oocyte maturation in the white croaker *Micropogonias furnieri* (Pisces: Sciaenidae) by human chorionic gonadotropin. *Braz. J. Biol.* 64, 73-80.
- Grau, A., Crespo, S., Riera, F., Pou, S., Sarasquete, M.C., 1996. Oogenesis in the amberjack *Seriola dumerili* Risso, 1810. Na histological, histochemical and structural study of oocyte development. *Sci. Mar.* 60, 391-406.
- Grier, H. Neidig, C., 2011. Gonads and gametes of fish. In: Tiersch, T.R., Green, C.C. (Eds.), *Cryopreservation in aquatic species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge. p. 19-32.
- Gwo, J.C., 2011. Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: Tiersch, T.R. & Mazik, P.M. (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge. p.459-481.
- Gwo, J.C., Strawn, K., Arnoldo, C.R., 1993. Induced ovulation in Atlantic croaker (Sciaenidae) using hCG and LHRH analog: A preliminary study. *Theriogenology* 39, 353-361.
- Haluch, C.F., Freitas, M.O., Corrêa, M.F.M., Abilhoa, V., 2009. Variação sazonal e mudanças ontogênicas de *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei, Sciaenidae) na baía de Ubatuba-Enseada, Santa Catarina, Brasil. *Pan-Am. J. Aquatic Sci.* 4, 347-356.
- Haluch, C.F., Abilhoa, V., Freitas, M.O., Corrêa, M.F.M., Hostim-Silva, M., 2011. Estrutura populacional e biologia reprodutiva de *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei, Sciaenidae) na baía de Ubatuba- Enseada, Santa Catarina, Brasil. *Biotemas* 24, 47-59.

- He, S., Woods III, C., 2003. The effects of osmolality, cryoprotectant and equilibration time on striped bass *Morone saxatilis* sperm motility. J. World Aquacult. Soc. 34, 255-265.
- Houssay, B. 1930. Acción sexual de la hipófisis en los peces y reptiles. Rev. Soc. Arg. Biol. 6, 686-688.
- Ihering, R.V. 1937. A method for induction spawning in fish. Prog. Fish Cult. 34, 15-16.
- Khan I.A., Lopez, E., Leloup-Hâtey, J.1997. Induction spermatogenesis and spermiation by a single injection of human chorionic gonadotropin in intact and hypophysectomia immature European eel (*Anguilla anguilla*). Gen. Comp. Endocrinol. 68, 91-103.
- Le Menn, F.L., Cerdà, J., Babin, P.J., 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: Babin, P.J., Cerdà, J., Lubzens, E. (Eds.) The fish oocytes: from basic studies to biotechnological applications. Springer - Netherlands. pp. 1-38.
- Lee, C., Donaldson, E.M., 2001. General discussion on “Reproductive biotechnology in finfish aquaculture”. Aquaculture 197: 303-320.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. Gen. Comp. Endocrinol. 165, 367-389.
- Mandich, A., Massari, A., Bottero, S., Marino, G., 2002. Histological and histochemical study of female germ cell development in the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). Eur. J. Histochem. 46, 87-100.
- Medeiros, S.F, Norman, R.J., 2006. Formas moleculares da gonadotrofina coriônica humana: características, ensaios e uso clínico. Rev. Bras. Ginecol.Obstet. 28, 251-263.
- Menezes, N., Figueiredo, J., 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV Teleostei (3). São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, pp. 96.

- Micale, V., Maricchiolo, G., Genovese, L., 1999. The reproductive biology of the amberjack, *Seriola dumerilii* (Risso 1810). I. Oocyte development in captivity. *Aqua. Res.* 30, 349-355.
- Mileva, V.R., Gilmour, K.M., Balshine, S., 2011. Effects of maternal stress on egg characteristics in a cooperatively breeding fish. *Comp. Biochem. Phys. A* 158, 22-29.
- Muchlisin, A. Z., 2005. Review: Current Status of Extenders and Cryoprotectants on Fish Spermatozoa Cryopreservation. *Biodiversitas* 6, 12-15.
- Muniz, E., Chaves, P., 2008. Condição reprodutiva da betara preta, *Menticirrhus americanus* (Teleostei, Sciaenidae), na pesca realizada no litoral norte de Santa Catarina, Brasil. *Acta Sci. Biol. Sci.* 30(4), 339-344.
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 516-34.
- Mylonas, C.C., Kyriakou, Y., Sigelaki, I., Georgius, G., Stephanou, D., Divanach, P., 2004. Reproductive biology of the shi drum (*Umbrina cirrosa*) in captivity and induction of spawning using GnRH $\alpha$ . *Isr. J. Aquacult.* 56(2): 75-92.
- Mylonas, C.C., Papadaki, M., Divanach, P., 2003. Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). *Aquat. Res.* 34, 1161-1170.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRH $\alpha$ -delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10, 463–491.
- Nash, T., 1966. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In *Cryobiology*. H. T. Meryman, editor. Academic Press, Inc., New York. pp.179-213.
- Nelson, J.S., 2006. *Fishes of the world*. 4<sup>th</sup> ed.. John Wiley, New York, 600p.

- Nhu, V.C., Nguyen, H.Q., Le, T.L., Tran, M.T., Sorgeloos, P., Dierckens, K., Reinertsen, H., Kjorsvik, E., Sveneevig, N., 2011. *Cobia *Rachycentron canadum** aquaculture in Vietnam: recent developments and prospects. *Aquaculture* 315, 20-25.
- Pankhurst, N.W., Porter, M.J.R., 2003. Cold and dark or warm and light: variations on the theme of environmental control of reproduction. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 385-389.
- Patiño, R., Sullivan, C.V., 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 57-70.
- Rideout, R. M., Litvak, M. K., Trippel, E., 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. *Aquac. Res.* 34, 653-659.
- Robins C, Ray G., 1986. A field guide to Atlantic coast fishes of North America. Houghton Mifflin Company, Boston, U.S.A. 354 p.
- Sampaio, L.A., Robaldo, R.B., Bianchini, A., 2008. Hormone-induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Aquac. Res.* 39, 712-717.
- Skoblina, M.N. 2010. Hydration of oocytes in teleost fishes. *Russ. J. Dev. Biol.* 41, 1-12.
- Smith, J., Wenner, C., 1985. Biology of the southern kingfish in the South Atlantic Bight. *T. Am. Fish. Soc.* 114, 356-366.
- Thorpe, J.E., 1994. Reproductive strategies in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquac. Res.* 25, 77-87.
- Tiersch, T.R., 2011. Cryopreservation in Aquatic species. In: Tiersch, T.R., Green, C.C. (Eds.) *Cryopreservation in Aquatic species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 1-17.

- Tiersch, T.R., Wayman, W.R., Skapura, D.P., Neidig, C.L., Grier, H.J., 2004. Transport and cryopreservation of sperm common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Aquac. Res.* 35, 278-288.
- Valenti, W., 2008. A aquicultura brasileira é sustentável? In: IV Seminário Internacional de Aquicultura, Maricultura e Pesca, Aquafair 2008. Florianópolis p.1-11.
- Van Der Kraak, G., Pankhurst, N.W., Peter, R.E., Lin, H.R., 1989. Lack of antigenicity of human chorionic gonadotropin in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture* 78, 81-86.
- Wayman, W.R., Thomas, R.G., Tiersch, T.R., 1997. Refrigerated storage and cryopreservation of black drum (*Pogonias cromis*) spermatozoa. *Theriogenology* 47, 1519-1529.
- Wayman, W.R., Tiersch, T.R., Thomas, R.G., 1998. Refrigerated storage and cryopreservation of sperm of red drum, *Sciaenops ocellatus* L. *Aquac. Res.* 29, 267-273.
- West, G., 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. *Aust. J. Mar. Freshwater Resh.* 41, 199-222.
- Yueh, W.S., Chang, C.F., 2000. Morphological changes and competence of maturing oocytes in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Zool. Stud.* 39, 114-122.
- Zaniboni-Filho, E., Weingartner, M., 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Rev Bras Reprod Anim.* 31, 367-373.
- Zhang, T., 2004. Cryopreservation of gametes and embryos of aquatic species. In: Fuller, B., Lane, N., Benson, E. (eds). *Life in the frozen state*. CRC Press. Boca Raton. pp. 415-435.
- Zohar, Y., Harel, M., Hassin, S., Tandler, A., 1995. Broodstock management and manipulation of spawning in the gilthead seabream, *Sparus aurata*. In: Bromage, N. & Roberts, R. J.

(eds). Broodstock Management and Egg and Larval Quality. London, Blackwell Science Press. pp. 94–117

Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99-136.

## **OBJETIVOS**

Considerando que o estudo da biologia reprodutiva é indispensável para o manejo reprodutivo de espécies introduzidas na aquicultura, a presente tese tem por objetivo buscar subsídios tecnológicos que otimizem a reprodução de *M. americanus* em cativeiro. Para alcançar esse objetivo foram propostas as diferentes linhas de estudo a seguir:

- 1 - Descrição do desenvolvimento ovocitário sob indução hormonal,
- 2 – Efetividade do hCG como indutor da maturação final dos ovócitos,
- 3 – Determinação da dosagem de hCG mais eficiente para a indução da maturação final e
- 4 – Caracterização do sêmen e sua conservação sob resfriamento e congelamento.

## CAPÍTULO 1

(Modelo Revista: Aquaculture)

### **Desenvolvimento ovocitário de *Menticirrhus americanus* sob indução com gonadotrofina coriônica humana (hCG)**

Cintia Labussière Nakayama <sup>a</sup>, Luís André Sampaio <sup>a</sup>, Luis Alberto Romano <sup>a</sup>, Ricardo Berteaux Robaldo <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, CP 474, CEP 96201-900 - Rio Grande – Brasil

<sup>b</sup> Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CP 354, CEP 96001-970 – Pelotas – Brasil

#### **RESUMO**

A importância de se conhecer o desenvolvimento ovocitário de uma espécie é poder determinar com precisão o período reprodutivo e os eventos durante o processo de maturação. Dessa forma o presente estudo descreve o desenvolvimento ovocitário de *Menticirrhus americanus* em cativeiro induzido com hCG. O papa-terra distribui-se ao longo da costa oeste do Atlântico entre a Argentina e os E.U.A., é um peixe eurialino apreciado na pesca esportiva e pelo sabor de sua carne. A descrição do desenvolvimento dos ovócitos foi realizado com fêmeas induzidas e não induzidas a maturação gonadal com hCG. As fêmeas intactas (tempo zero) tiveram as gônadas dissecadas após biópsia dos ovócitos e nas induzidas, as gônadas foram amostradas em dois diferentes períodos: na metade (20h) e ao final (40h) do período de latência estimado. Assim os ovócitos foram analisados em três diferentes tempos, quando foram verificadas diferenças no tamanho e proporção dos ovócitos nos diferentes estádios de desenvolvimento. Os resultados permitiram a identificação dos diferentes estádios de



desenvolvimento ovocitário em fase pré-vitelogênica (ovócito primário e secundário) vitelogênica (ovócitos em vitelogênese lipídica e em vitelogênese lipídica e protéica) e pós-vitelogênica (ovócito hidratado). Esses resultados demonstraram o efeito do hCG no recrutamento de ovócitos vitelogênicos para ovócitos hidratados em *M. americanus*.

## **ABSTRACT**

Knowledge in the oocytes development of specie is important to establish accurately the reproductive season and the events related to maturation process. Then, the present study describes the *Menticirrhus americanus* oocytes development in captive using hCG. The Southern kingfish is distributed along the Atlantic west coast from Argentina to U.S.A. *M. americanus* is appreciated in sport fishery and the quality of its flesh, with potential to promote marine and estuarine aquaculture. The oocyte development description was divided in females not and hormonal induced. The not induced female had the gonad collected right after oocyte biopsy (zero time) and females induced in two different times in the middle and in the final of latency period. Then, the oocytes were assessed in three different periods when significant difference was detected to oocytes diameter and the ratio of different development stages. The results allowed to describe the developmental oocyte stages, previtellogenic (primary and secondary oocytes) vitellogenic (lipid globule and lipid globule and yolk granule) and *post* vitellogenic (hydrated oocyte). These results demonstrated the hCG effects of vitellogenic oocytes recruitment to hydrated oocyte in *M. americanus*.

## INTRODUÇÃO

O papa-terra *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) é um Sciaenidae distribuído ao longo das regiões subtropical e tropical da costa oeste do Atlântico, podendo ser encontrado desde a província de Buenos Aires, na Argentina, até Cape Cod em Massachussets, E.U.A. (Menezes e Figueiredo, 1980). No Brasil, assim como nos E.U.A. o papa-terra é apreciado na pesca esportiva e pela qualidade e sabor de sua carne (Smith e Wenner, 1985, Braun e Fontoura, 2004). O tamanho estimado para a reprodução é de 22,8 cm para as fêmeas e 21,2 cm para os machos (Haluch et al., 2011). Entretanto, são escassos os estudos sobre a biologia reprodutiva desta espécie.

Os estudos reprodutivos em teleósteos utilizam a histologia como um método de verificação eficiente e precisa do desenvolvimento dos gametas (West, 1990). A análise histológica permite determinar condição de saúde, disfunções e os diferentes estádios durante o processo de maturação gonadal (Blazer, 2002).

Em geral, as condições ambientais regulam o período reprodutivo das espécies, iniciando o processo de maturação dos ovócitos. O meio externo será o responsável por engatilhar o processo endócrino que resulta na síntese de gonadotrofinas, essenciais para o desenvolvimento dos gametas (Le Menn et al., 2007). No entanto, é frequente que animais em cativeiro iniciem o desenvolvimento ovocitário (vitelogênese), mas interrompam esse processo sem alcançar a maturação final (hidratação e desova), regredindo e reabsorvendo os ovócitos (Mylonas et al, 1997). Assim, para contornar esse problema é feita a administração de hormônios maturacionais exógenos.

O uso de hormônios permite controlar a reprodução em cativeiro (García-Alonso e Vizziano, 2004). Os hormônios mais comumente utilizados são o extrato hipofisário de carpa,

hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH) ou gonadotrofina coriônica humana (hCG), sendo o hCG amplamente empregado pela facilidade de compra e padronização das dosagens (Zohar e Mylonas, 2001). O hCG atua diretamente nas gônadas, sinalizando para a síntese de esteróides que age na recrudescência gonadal, maturação final e desova.

Assim, reconhecendo a importância da reprodução assistida como etapa crucial ao desenvolvimento da produção desta espécie, o objetivo do presente é verificar o efeito do hCG no desenvolvimento ovocitário de *M. americanus*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Nove fêmeas de *M. americanus* com peso total de  $134 \pm 45$  g e comprimento total de  $23.8 \pm 2.5$  cm foram usadas para o acompanhamento do desenvolvimento ovocitário. As fêmeas foram capturadas no período do verão, com linha e anzol na Praia do Cassino – Rio Grande do Sul ( $32^{\circ}12'05''S$  -  $52^{\circ}10'05''W$ ) e transportadas até o Laboratório de Piscicultura Marinha e Estuarina da Universidade Federal do Rio Grande, localizado na mesma praia. No laboratório as fêmeas foram mantidas individualmente por 12h em tanques de 140 L, com água do mar filtrada na temperatura de  $23^{\circ}C$  e sob aeração suave.

As fêmeas foram previamente anestesiadas em banho de benzocaína (50ppm - protocolo ético de anestesia Rosalind Franklin University of Medicine and Science). Todas as fêmeas passaram por biópsia, sendo as amostras de ovócitos coletadas com uma cânula flexível (650  $\mu$ m de diâmetro interno). As amostras foram mantidas em solução fisiológica (NaCl 0,9%) até a medição do diâmetro dos maiores folículos ( $n = 10$ ) em estereomicroscópio. Foram utilizadas apenas as fêmeas com folículos de diâmetro médio de 385  $\mu$ m.

Nas fêmeas não induzidas (n = 3), as gônadas foram dissecadas, logo após morfometria e biópsia (tempo zero). As fêmeas induzidas foram divididas em fêmeas que tiveram as gônadas removidas aproximadamente na metade do período de latência (n = 3) (20h, pós-indução) e fêmeas dissecadas ao final do período de latência (n = 3) (40h, pós-indução).

Nas induções foram utilizadas uma dosagem única de 300 UI de hCG kg<sup>-1</sup> administrada por via intramuscular no dorso das fêmeas. Testes prévios demonstraram que as fêmeas dessa espécie induzidas nessa dosagem e mantidas na temperatura da água em 23°C apresentavam período de latência de 39h. O período de latência corresponde ao intervalo de tempo entre a indução e a desova. As gônadas antes de serem fixadas foram pesadas para compor o índice gonadosomático (IGS).  $IGS = (\text{peso das gônadas} / \text{peso total}) * 100$ .

Após atingirem os devidos tempos de coleta as gônadas foram dissecadas, pesadas e seccionadas para processamento histológico. As partes seccionadas foram conservadas em solução fixadora Bouin durante 4h, e após foram transferidas para etanol 70% até seu processamento. O processamento inicial foi de desidratação em séries de etanol (LUPE PT 05 - Lupetec - São Carlos - São Paulo - Brasil) e seguido de inclusão em Paraplast® (Mc Cormick Scientific - St. Louis - Missouri - E.U.A.), seccionadas (4 µm) em micrótomo (LUPE MRP 03 - Lupetec - São Carlos - São Paulo - Brasil). Os cortes histológicos foram corados em hematoxilina-eosina (H-E) e em ácido periódico Schiff (PAS). As lâminas foram examinadas em microscópio (Olympus BX 45 - Olympus America Inc. Center Valley - Pennsylvania - E.U.A.) dotado de câmera (Olympus DP 72 - Olympus America Inc. Center Valley - Pennsylvania - E.U.A.) para captura das imagens.

A classificação dos estádios do desenvolvimento dos ovócitos foi baseada em West (1990) e Vazzoler (1996), conforme descrita a seguir: **Oogônia (OO)** – células pequenas,

agrupadas em ninhos, com citoplasma escasso, núcleo esférico basófilo e preenchendo quase toda célula, com um nucléolo; **Ovócito primário (OI)** – denominado como estágio de cromatina nucleolar, de maior tamanho que OO, poliédrico ou arredondado, com núcleo esférico basófilo com um ou vários nucléolos basófilos espalhados pelo núcleo; **Ovócito secundário (OII)** – denominado de perinucleolar, maior tamanho que os OI, poliédrico, com nucléolos esféricos e periféricos, menores que em OI, o núcleo não é tão basófilo como em OI; **Ovócito em vitelogênese lipídica (OIII)** – célula arredondada, maiores que os OII, com núcleo em desenvolvimento e citoplasma ainda basófilo, com a presença de glóbulos de lipídios iniciais, visualização mais nítida das camadas dos folículos que continuam a crescer; **Ovócito em vitelogênese lipídica e protéica (OIV)** – célula grande e arredondada, núcleo em início de polarização, vesículas de lipídios maiores que em OIII, e aparecimento de grânulos vitelogênicos acidófilos, ovócito com predominância acidófila, aumento e diferenciação das camadas do folículo, com espessamento da camada da zona radiata; **Ovócito hidratado (OV)** – células grandes de formato irregular, coalescência das vesículas de lipídio formando uma ou mais gota de óleo, coalescência dos grânulos de vitelo que preenchem quase todo o ovoplasma, o núcleo se torna imperceptível e sem carioteca; **Atresia (A)** – célula em processo de reabsorção, envoltas pelas camadas do folículo mais espessas, disformes e/ou em desorganização celular. **Folículos pós ovulatórios (PO)** - folículos vazios devido a liberação do ovócito (ovulação), com células hipertrofiadas às vezes preenchendo o lúmen folicular.

Para determinar a densidade celular e o diâmetro dos ovócitos em cada estágio de desenvolvimento foram feitas as contagens das células em cada estágio de desenvolvimento por área ( $\times \mu\text{m}^2$ ) e a medição do diâmetro dos ovócitos. Esses dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de comparação *post hoc* de Tukey. Valores em

porcentagem foram transformados pela função raiz quadrada do arco de seno, porém para composição das figuras foram considerados dados não transformados. Todos os testes consideraram um nível de significância de 95% ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS

O ovário de *M. americanus* apresenta morfologia bilobada, sendo tipo cistovário com liberação do ovócito hidratado para a cavidade ovariana.

Os IGS nos tempos zero, 20 e 40h e foram 1,4 % ( $\pm 0,5$ ), 2,8 % ( $\pm 1,8$ ) e 2,6 % ( $\pm 1,9$ ), respectivamente, e não apresentaram diferenças significativas entre os tempos ( $P > 0,05$ ).

O diâmetro inicial médio dos ovócitos das biópsias (Fig. 1A) no tempo zero ( $394 \pm 35 \mu\text{m}$ ), 20 h ( $410 \pm 38 \mu\text{m}$ ) e 40 h ( $395 \pm 30 \mu\text{m}$ ) não apresentaram diferenças significativas. O aumento dos ovócitos foi significativo após 40 h ( $751 \pm 72 \mu\text{m}$ ) (Fig.1B).

As laminas histológicas permitiram verificar particularidades para alguns estádios no processo de maturação dos ovócitos em *M. americanus* (Fig. 2).

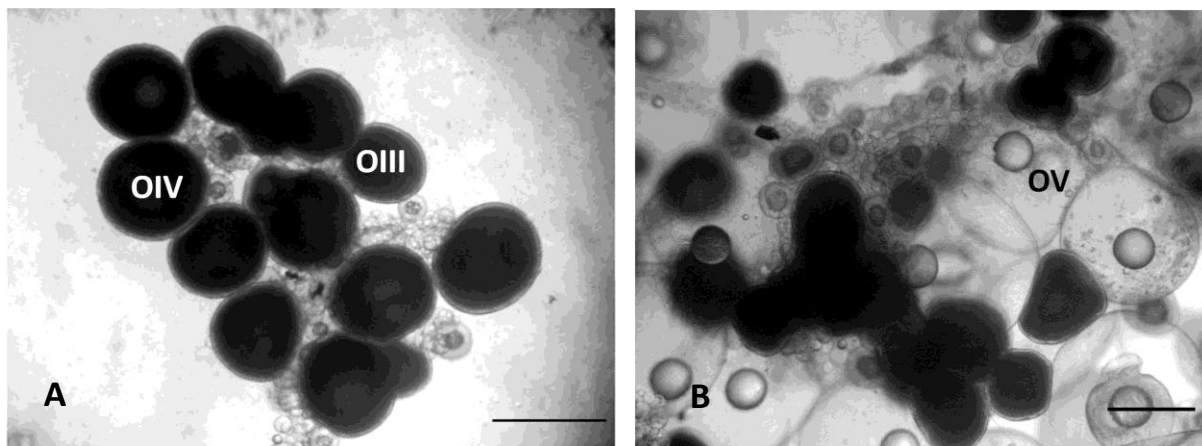


Figura 1. Ovócitos de *Menticirrhus americanus* coletados em diferentes tempos, por biópsia em meio de NaCl 0,9%. . A – Ovócitos coletados no início do tratamento, com ovócitos maiores em

estádio de vitelogênese lipídica (OIII) e vitelogênese lipídica e protéica (OIV). B – Ovócitos coletados ao final do período de latência em diferentes estádios (40h), com ovócitos hidratados (OV), vitelo coalescido e gotícula de óleo. Barras = 400  $\mu\text{m}$ .

O OI apresentou formato poliédrico, com vários nucléolos espalhados pelo núcleo basófilo. OIII esféricos com núcleo (vesícula germinal) grande e acidófilo, com ovoplasma desenvolvido, predominantemente basófilo apresentando deposição crescente de glóbulos lipídicos a partir da região cortical até a formação de um anel em torno do núcleo; aparecimento inicial de grânulos de vitelo e formação do alvéolo cortical. O OIV é grande, esférico, predominantemente acidófilo, devido à concentração de grânulos de vitelo, camada folicular espessa e diferenciada; início da coalescência dos glóbulos lipídicos em vesículas maiores; presença de alvéolos corticais e migração do núcleo (Figs. 3 e 4). OV hidratado com gota única de lipídio, predominância de vitelo acidófilo coalescido com regiões basófilas (“residuais”) na periferia do ovoplasma em algumas células (Fig. 4C).

Na análise histológica, o diâmetro médio dos ovócitos apresentou diferença significativa entre os estádios de desenvolvimento (Tabela 1).

Tabela 1: Diâmetro médio ( $\pm$ DP) dos ovócitos de *Menticirrhus americanus* em cortes histológicos de gônadas sem indução no tempo zero e sob indução com hCG, nos tempos 20 e 40h (período latência).

Tempo	OI ( $\mu\text{m}$ )	OII ( $\mu\text{m}$ )	OIII ( $\mu\text{m}$ )	OIV ( $\mu\text{m}$ )	OV ( $\mu\text{m}$ )
Zero	45 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	69 $\pm$ 9 <sup>b</sup>	165 $\pm$ 37 <sup>c</sup>	257 $\pm$ 43 <sup>d</sup>	-
20h	53 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	85 $\pm$ 17 <sup>b</sup>	152 $\pm$ 25 <sup>c</sup>	326 $\pm$ 34 <sup>d</sup>	-
40h	45 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	73 $\pm$ 20 <sup>b</sup>	139 $\pm$ 25 <sup>c</sup>	220 $\pm$ 35 <sup>d</sup>	399 $\pm$ 99

\*Letras distintas nas linhas representam diferença significativa entre médias (ANOVA, Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

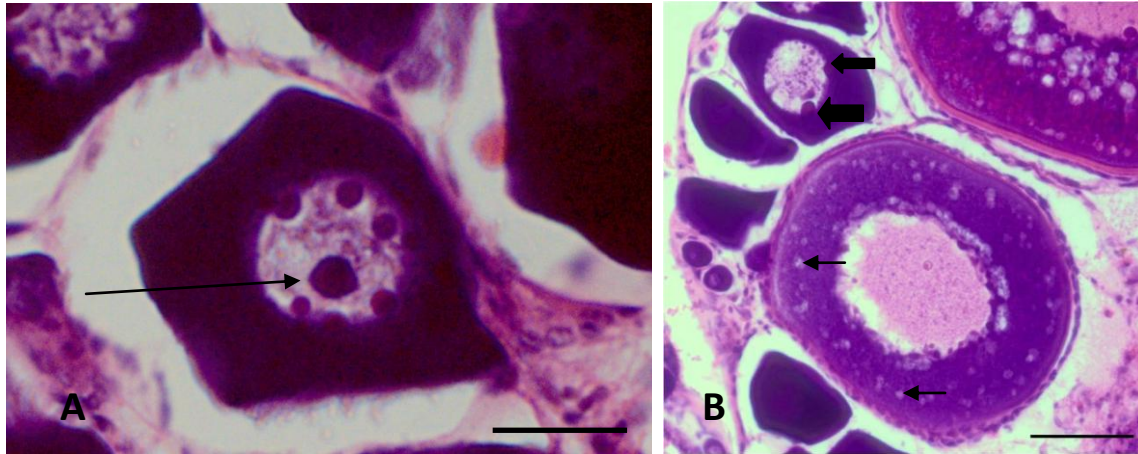


Figura 2. Fotomicrografia de ovócitos de *Menticirrhus americanus*. A - Ovócito primário (OI) (seta fina e longa) indicando presença de nucléolos dispersos. Barra = 20  $\mu\text{m}$ . B - Ovócitos secundários (OII) (seta grossa) indicando nucléolos periféricos e ovócitos em vitelogênese lipídica (OIII), menos basófilo que OII, com glóbulos lipídicos (seta pequena). Barra = 50  $\mu\text{m}$ . Coloração H-E.

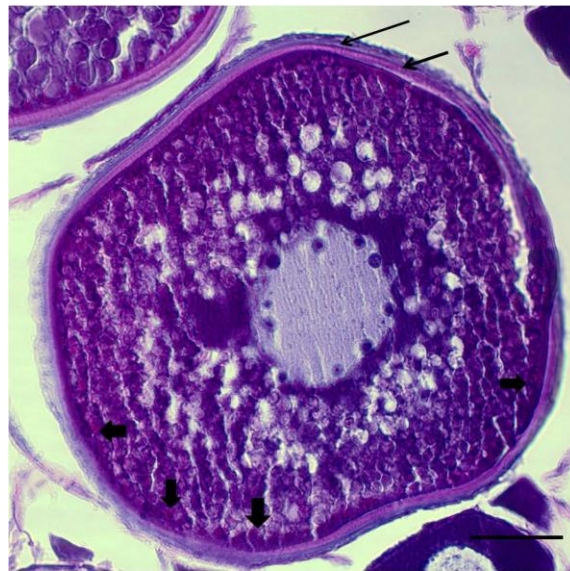


Figura 3. Fotomicrografia de ovócito de *Menticirrhus americanus* em vitelogênese lipídica e protéica (OIV) em detalhe alvéolos corticais (setas grossas), fortemente acidófilo e camadas interna (seta menor) e externa (seta maior) da zona radiata. Barra = 40  $\mu\text{m}$ . Coloração PAS.



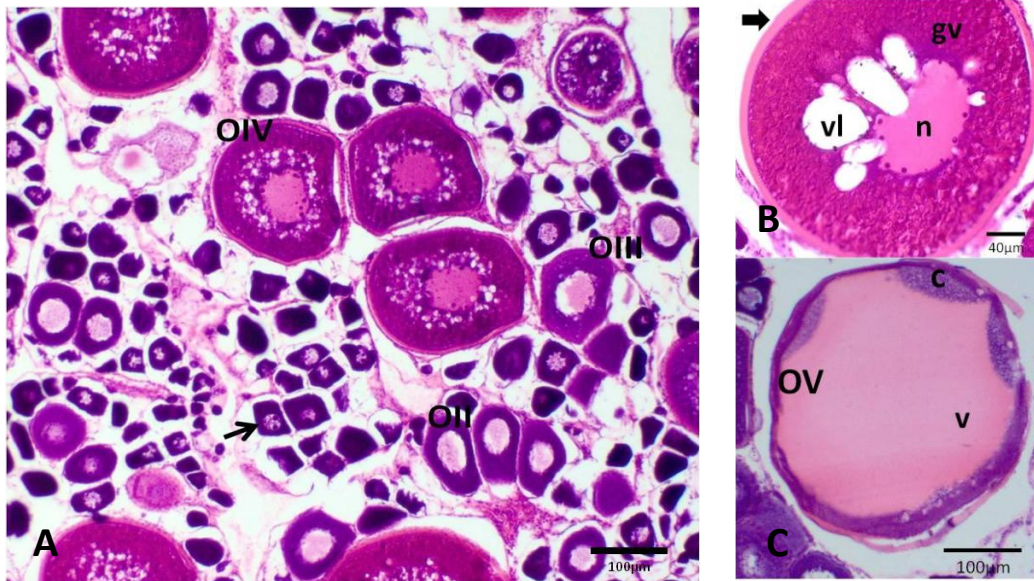
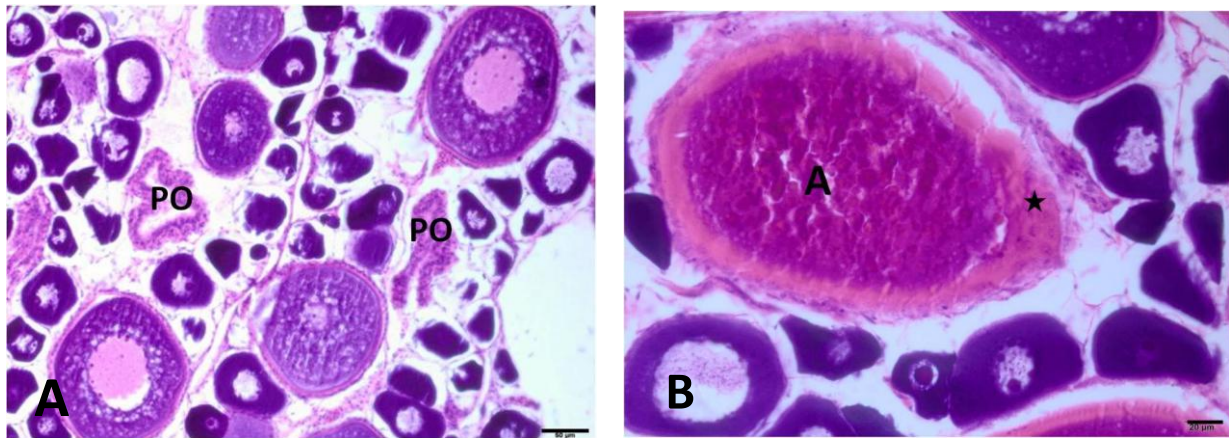


Figura 4. Identificação de ovócito de *Menticirrhus americanus* em diferentes estádios de desenvolvimento. A- Ovócito primário (OI) (seta fina), poliédrico com núcleo basófilo e nucléolos dispersos. Ovócito secundário (OII) com núcleo levemente acidófilo e nucléolos periféricos. Ovócitos em vitelogênese lipídica (OIII) presença de glóbulos de lipídio, núcleo acidófilo. Ovócito em vitelogênese lipídica e protéica (OIV) esférico, com núcleo concêntrico, e cercado por glóbulos de lipídio e ovoplasma repleto de grânulos de vitelo. Barra = 100  $\mu$ m. B- OIV em estágio avançado, grânulos de vitelo (gv), núcleo (n) migrando para periferia, coalescência em vesículas de lipídio (vl) e camada da zona radiata (seta grossa). Barra = 40  $\mu$ m. C – Ovócito hidratado (OV) com grânulos de vitelo coalescidos em massa vitelínica uniforme (v) e resíduo de citoplasma (c). Barra = 100  $\mu$ m. Coloração H-E.



Figuras 5: Corte histológico de ovário de *Menticirrhus americanus*. A - Folículos pós ovulatórios (PO). Barra = 50  $\mu$ m. B - Folículo atrésico (A), caracterizado pela desorganização celular e espessamento das camadas do folículo (estrela). Barra = 20  $\mu$ m. Coloração H-E.

A porcentagem média dos ovócitos em diferentes estádios de desenvolvimento para as fêmeas não induzidas e induzidas são apresentadas na Fig.6, com exceção das oogônias que não foram computadas. Todas as amostras possuíam ovócitos em estágio OI, OII, OIII e A. Os folículos pós ovulatórios estavam presentes apenas em gônadas coletadas em 40h (Fig. 5).

A comparação da área ocupada pelos ovócitos em secções histológicas transversais, nos diferentes estádios de desenvolvimento, dentro e dentre os tempos é apresentada na Tab.2. Os resultados mostram aumento de área para OIV quando utilizada indução (20h) ( $P < 0,05$ ). Em 40h as áreas foram ocupadas igualmente entre OI, OII, OIII, OIV ( $P > 0,05$ ). Para os ovócitos em atresia (A) a área é reduzida quando as fêmeas são induzidas com hCG ( $P < 0,05$ ).

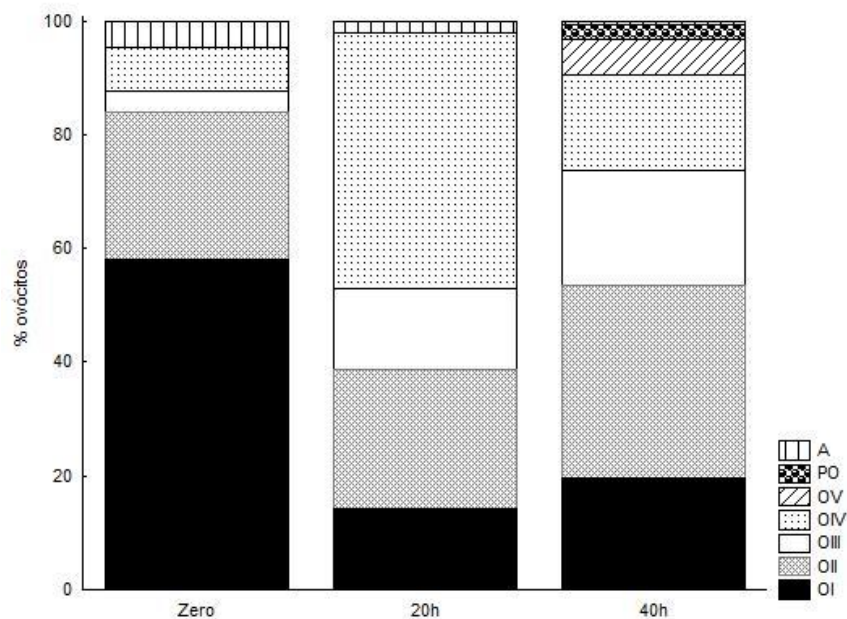


Figura 6: Porcentagem de ovócitos nas gônadas de *Menticirrhus americanus* não induzidas (S) e induzidas com hCG (300 UI.kg<sup>-1</sup>), amostradas na metade (20h) e no final do período de latência (40h).

Tabela 2: Área ocupada (média ± DP) pelos ovócitos nos diferentes estádios de desenvolvimento, em cortes transversais de ovário de *Menticirrhus americanus* nos tempos zero, 20 e 40h.

	OI	OII	OIII	OIV	A	OV	PO
	(x10 <sup>-6</sup> μm <sup>2</sup> )						
Zero	19,7 ± 9,1 <sup>aA</sup>	8,5 ± 7,6 <sup>aB</sup>	1,3 ± 1,8 <sup>aC</sup>	2,4 ± 2,0 <sup>aC</sup>	1,6 ± 1,6 <sup>aC</sup>	-	-
20h	3,2 ± 2,9 <sup>bB</sup>	11,1 ± 3,3 <sup>aB</sup>	3,1 ± 2,9 <sup>bB</sup>	9,7 ± 1,8 <sup>bA</sup>	0,2 ± 0,4 <sup>bC</sup>	-	-
40h	6,8 ± 6,1 <sup>bA</sup>	9,4 ± 6,2 <sup>aA</sup>	5,2 ± 3,0 <sup>cA</sup>	4,5 ± 2,4 <sup>aA</sup>	0,1 ± 0,3 <sup>bB</sup>	1,7 ± 0,9 <sup>B</sup>	2,0 ± 2,0 <sup>B</sup>

\*Letras minúscula distintas na mesma coluna representam diferença significativas (P<0,05) da área ocupada pelos ovócitos no mesmo estádio de desenvolvimento e letras maiúsculas na mesma linha representam entre os tempos (ANOVA uma via seguida do Teste de Tukey, α = 5%).

## DISCUSSÃO

A maturação dos ovócitos no período reprodutivo é gradual e a medida que os ovócitos crescem as gônadas aumentam seu peso. Dessa forma é possível estabelecer um índice (IGS) ao longo do ano, sendo os maiores índices correspondentes ao período reprodutivo. Para fêmeas de *M. americanus* os maiores IGS foram registrados na primavera (1,5%) (Haluch et al., 2011). Os valores de IGS do presente estudo estão de acordo ao descrito para espécie no mesmo período, quando as gônadas são consideradas maduras confirmada pela presença de ovócitos em estádios vitelogênicos e hidratados.

O aumento do diâmetro dos ovócitos de OIV para OV (92%) se deve ao processo de hidratação e um aumento semelhante foi descrito para *Morone saxatilis* a hidratação apresentou valor próximo (100%) (Mylonas et al., 1997).

Algumas particularidades nas diferenças morfológicas foram observadas durante o desenvolvimento ovocitário de *M. americanus* sob o efeito do hCG. Embora não seja uma característica exclusiva da espécie, em OI de *M. americanus* apresentam vários nucléolos dispersos no núcleo, assim como foi descrito para *Sciaena umbra* e *Seriola dumerili* (Grau, et al., 1996, Grau et al., 2009).

A deposição inicial de glóbulos de lipídio na região cortical em OIII do presente estudo pode estar relacionada à entrada de lipoproteínas de muito baixo peso molecular (VLDL) que penetram facilmente pela membrana proveniente do sangue e por isso nos estádios iniciais de vitelogênese lipídica os glóbulos de lipídios são evidenciadas na periferia do ovoplasma e não no entorno do núcleo (Le Menn et al., 2007). Na maioria dos teleósteos, a fase vitelogênica lipídica, é caracterizada ainda pela discreta de vitelogenina no ovócito, podendo ainda ocorrer formação de alvéolos corticais (Grau et al., 1996). A maior deposição de alvéolos corticais em OIV é

atribuída ao processo de maturação. O principal conteúdo desses alvéolos é de grânulos de coriogenina, proteína importante no processo de enrijecimento do córion no momento da fertilização que evita a poliespermia em teleósteos (Le Menn et al., 2007, Prakash e Sehgal, 2007).

A ordem de ocorrência de formação dos glóbulos de lipídio, grânulos de proteína e alvéolos corticais nos ovócitos é espécie específica (Micale et al., 1999). Para a maioria dos teleósteos a ordem tem sido alvéolos corticais, glóbulos de lipídios e por fim grânulos de vitelo (Selman e Wallace, 1986, Grau et al., 1996,). Em *S. dumerili* e *M. saxatilis* foram observados o aparecimento primeiro de glóbulos de lipídios, alvéolos corticais e grânulos de vitelo (Grau et al., 1996, Groman, 1982) .

No presente trabalho a ordem de formação nos ovócitos de *M. americanus*, foi alvéolos corticais e glóbulos de lipídios, e posteriormente os grânulos de vitelo. As lâminas analisadas sugerem o aparecimento simultâneo de alvéolos corticais e glóbulos de lipídio.

Embora em estágio mais avançado (final) de OIII em *M. americanus* fosse verificado o aumento da quantidade de grânulos de vitelo, esse processo é mais intenso em OIV. Correspondendo a entrada de vitelogenina que é armazenada na forma de vesículas, que por sua vez se fusionam aos lisossomos. A presença de enzimas, principalmente de catepsina D no lisossomo, transforma a vitelogenina em grânulos de proteína do vitelo (Carnevali et al., 1999, Le Menn et al., 2007). Além disso, esse estágio foi marcado pelo processo de coalescência dos glóbulos de lipídios em vesículas maiores. À medida que essas vesículas aumentavam de tamanho elas se concentravam no centro do ovócito para formação da gota de lipídio única e o núcleo migrava para a periferia para a formação o pólo animal.

O estágio de OIV é considerado crucial, pois a partir desse momento os ovócitos avançam para o processo de maturação final ou entram em atresia. Ainda não são bem conhecidas as causas da atresia na disfunção reprodutiva. Porém pode estar relacionada a problemas nutricionais, estresse, desregulação endócrina, entre outros. No papa-terra, como nas demais espécies, os ovócitos no estágio atrésico foram caracterizados pela fragmentação da zona radiata e hipertrofia das camadas de células granulosa e teca (Micale et al., 1999).

No entanto, no presente estudo foi possível verificar a diminuição significativa da área ocupada por ovócitos atrésicos quando as fêmeas foram induzidas, bem como a porcentagem dos ovócitos nessa condição, evidenciando a efetividade do hCG sobre o provável efeito deletério da desregulação endócrina reprodutiva. Esse efeito benéfico da indução hormonal só foi evidenciado a partir de OIV, na condição de pré-hidratação. A hidratação, desenvolvida nos OV, dá-se pelo ganho osmótico de água na célula. O processo de hidratação é considerado ainda responsável pela expansão do tamanho do ovócito que auxilia no rompimento do folículo (ovulação) juntamente com a ação parácrina sinérgica de prostaglandinas (Patiño et al., 2003).

O aumento da osmolalidade do ovócito é resultante da proteólise do vitelo, produzindo osmólitos orgânicos endógenos à base de aminoácidos polares livres. Com isso o aumento da osmolalidade promove a hidratação da célula. As quantidades de solutos e os diferentes solutos formados explicam porque diferentes espécies possuem maior ou menor hidratação do ovócito (Skoblina, 2010, Fabra et al., 2005).

Alguns OV de *M. americanus* apresentaram ainda uma fina camada de citoplasma. A mesma descrição foi vista em *Morone saxatilis* e em *Epinephelus marginatus*, mas os autores não apresentaram detalhes sobre a presença dessa camada (Mylonas et al., 1997, Mandich et al., 2002).

Para cada estágio de desenvolvimento foi possível verificar diferença no crescimento em diâmetro dos ovócitos até a hidratação e esse aumento crescente é o resultado dos processos de endocitose e síntese de vitelo.

Considerando os momentos de ação do hCG nesse trabalho verificamos que houve variação na proporção, para a maioria dos estágios, ao longo do período de maturação gonadal. Com maior uniformidade entre os diferentes estágios ovocitários ao término do período de latência 39h para esse hormônio, previsto em ensaios preliminares com *M. americanus*.

O desenvolvimento ovocitário, sob efeito do hCG ocorre em mais de dois grupos de ovócitos principalmente nos OIV e OV. Esse padrão de recrudescência gonadal está de acordo com a classificação de desenvolvimento ovocitário sincrônico em mais de dois grupos proposta por Vazzoler (1996).

Quanto a distribuição dos ovócitos entre os estágios de desenvolvimento, foi verificado que a porcentagem de OI e OII são predominantes no tempo zero, porém a área desses estágios, nos cortes histológicos, diminuem no tempo de 20 e 40h. Em contrapartida, as áreas seccionais dos ovócitos a partir de OIII, aumentam nesses períodos. Esse padrão de desenvolvimento está relacionado às modificações ocorridas, no período reprodutivo natural da espécie, das gônadas até a maturação (Haluch et al., 2011).

O presente estudo demonstrou histologicamente o efeito do hCG na indução a maturação final de ovócitos ao término da vitelogênese e o recrutamento de estágios ovocitários ainda em vitelogênese. As informações contidas no presente estudo são importantes para entender a maturação final dos ovócitos em cativeiro e ainda utilizar os dados em estudos futuros na reprodução de *M. americanus*.

## REFERÊNCIAS

- Blazer, V.S. 2002. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 85-101.
- Braun, A., Fountoura, N., 2004. Reproductive biology of *Menticirrhus americanus* in southern Brazil (Actinopterygii: Perciforme: Sciaenidae). *Neotrop. Ichthyol.* 2(1), 31-36
- Carnevali, O., Carletta, R., Cambi, A., Vita, A., Bromage, N., 1999. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: Involvement of two lysosomal proteinases. *Biology of reproduction* 60, 140-146.
- Fabra, M., Raldúa, D., Power, D., Deen, P.M.T., Cerdà, J. 2005. Marine fish egg hydration is aquaporin-mediated. *Science* 307, 545.
- García-Alonso, J, Vizziano, D., 2004. Induction of oocyte maturation in the white croaker *Micropogonias furnieri* (Pisces: Sciaenidae) by human chorionic gonadotropin. *Braz. J. Biol.* 64, 73-80.
- Grau, A., Crespo, S., Riera, F., Pou, S., Sarasquete, M.C., 1996. Oogenesis in the amberjack *Seriola dumerili* Risso, 1810. Na histological, histochemical and structural study of oocyte development. *Sci. Mar.* 60, 391-406.
- Grau, A., Linde, M., Grau, A.M., 2009. Reproductive biology of the vulnerable species *Sciaena umbra* Linnaeus, 1758 (Pisces: Sciaenidae). *Sci. Mar.* 73, 67-81.
- Groman, D.B., 1982. Reproductive system. In: Groman, D.B. (ed.). *Histology of striped bass*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. p.53-58.
- Haluch, C.F., Abilhoa, V., Freitas, M.O., Corrêa, M.F.M., Hostim-Silva, M., 2011 Estrutura populacional e biologia reprodutiva de *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758)



- (Teleostei, Sciaenidae) na baía de Ubatuba- Enseada, Santa Catarina, Brasil. *Biotemas* 24, 47-59.
- Le Menn, F., Cerdà, J., Babin, P.J., 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: Babin, P.J., Cerdà, J., Lubzens, E. (Eds.) *The fish oocytes: from basic studies to biotechnological applications*. Springer - Netherlands. 1-38p.
- Mandich, A., Massari, A., Bottero, S., Marino, G., 2002. Histological and histochemical study of female germ cell development in the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Eur. J. Histochem.* 46, 87-100.
- Menezes, N., Figueiredo, J., 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV Teleostei (3). São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 96p.
- Micale, V., Maricchiolo, G., Genovese, L., 1999. The reproductive biology of the amberjack, *Seriola dumerilii* (Risso 1810). I. Oocyte development in captivity. *Aqua. Res.* 30, 349-355.
- Mylonas, C.C., Woods III, L.C., Zohar, Y., 1997. Cyto-histological examination of post-vitellogenesis and final oocyte maturation in captive-reared striped bass. *Journal of fish biology* 50, 34-49.
- Patiño, R., Thomas, P., Yoshizaki, G., 2003. Ovarian follicle maturation and ovulation: an integrated perspective. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 305-308.
- Prakash, O., Goswami, S., Sehgal, N., 2007. Establishment of ELISA for murrel vitellogenin and choriogenin, as biomarkers of potential endocrine disruption. *Comp. Biochem. Phys. A* 146, 540 - 551.

- Protocolo ético de anestesia Rosalind Franklin University of Medicine and Science. Institutional Animal Care and use Committee. Acesso website: <http://rosalindfranklin.edu/dnn/research/animal/guideines/tabid/763/default.aspx>
- Selman, K., Wallace, R.A., 1986. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus* IV. Yolk vesicle formation. J. Exp. Zool. 239, 277-288.
- Skoblina, M.N. 2010. Hydration of oocytes in teleost fishes. Russ. J. Dev. Biol. 41, 1-12.
- Smith, J., Wenner, C., 1985. Biology of the southern kingfish in the South Atlantic Bight. Trans. Am. Fish. Soc. 114, 356-366.
- Vazzoler, A.E.M., 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática. UDEM. Maringá. 169p.
- West, G., 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. Aust. J. Mar. Freshwater Resh. 41, 199-222.
- Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture 197, 99-136.

## CAPÍTULO 2

(Modelo Revista: Atlântica)

### **Reprodução induzida do papa-terra *Menticirrhus americanus* (Pisces: Sciaenidae) utilizando hCG**

Cintia Labussière Nakayama<sup>a</sup>, Luís André Sampaio<sup>a</sup> e Ricardo Berteaux Robaldo<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, CP 474, CEP 96201-900 - Rio Grande – Brasil

<sup>b</sup> Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CP 354, CEP 96001-970 – Pelotas – Brasil

#### **RESUMO**

O papa-terra, *Menticirrhus americanus* está distribuído ao longo da costa oeste do Oceano Atlântico. Assim como outros Sciaenidae, o papa-terra vem sendo considerado como uma espécie com potencial para a piscicultura marinha e estuarina. Como parte do sucesso da criação é a reprodução, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de reproduzir *M. americanus* em cativeiro utilizando hCG. As fêmeas foram induzidas com uma dosagem de 300 UI hCG.kg<sup>-1</sup>. Foi obtido sucesso em 60 % das fêmeas induzidas. O período de latência foi de 38,1 ± 3,4h, os ovos mediram 730 ± 0,06 µm de diâmetro, com taxas de fertilização e eclosão de 63,8 ± 14,5 % e 43,3 ± 10,7 %, respectivamente. A fecundidade relativa variou de 40.080 a 294.000 ovos.kg<sup>-1</sup>. Os resultados demonstram que as fêmeas de papa-terra são sensíveis ao hCG e que é possível obter larvas viáveis a partir de fertilização artificial.

**Palavras chave:** maturação final, larva e hormônio

## ABSTRACT

The Southern kingfish *Menticirrhus americanus* is distributed along of Atlantic West Coast. Such as others Sciaenidae the Southern kingfish has been potentially considered to marine and estuarine fish culture. Part of successful in captivity is reproduction, and then the study aimed evaluates the *M. americanus* reproduction in captivity using hCG. The females were induced with 300 IU hCG.kg<sup>-1</sup> BW. The spawning successful was obtained in 60% induced. The latency period was 38.1 ± 3.4 h, the eggs diameter was 730 ± 0.06 µm, fertilization and hatching rate were 63.8 ± 14.5 % e 43.3 ± 10.7 %, respectively. The relative fecundity ranged from 40,080 to 294,000 eggs.kg<sup>-1</sup>. The results showed the Southern kingfish is sensible to hCG and its possible larvae production from artificial reproduction.

**Keywords:** final maturation, larva and hormone

## INTRODUÇÃO

O papa-terra *Menticirrhus americanus* é distribuído ao longo da costa oeste do Oceano Atlântico, desde a Argentina até o os Estados Unidos (Menezes & Figueiredo 1980). Esta espécie é apreciada no litoral sul do Brasil para a prática da pesca esportiva e pelo sabor e qualidade da sua carne. Assim como outros Scianidae, como o red drum *Sciaenops ocellatus* (Holt et al. 1990) e a corvina *Micropogonias undulatus* (Creswell et al. 2007), espécies criadas com sucesso em outros países, o papa-terra vem sendo considerado para a aquicultura. O fato de ser uma espécie eurialina é outra característica importante para o desenvolvimento da piscicultura estuarina (Miranda et al. 2008).

Um dos pilares para a viabilidade e sustentabilidade da aquicultura é o fechamento do ciclo de vida da espécie em cativeiro. Domesticação, seleção e melhoramento genético das

espécies criadas em cativeiro dependem diretamente do controle da reprodução (Donaldson 1996).

Devido as dificuldades impostas pelo confinamento à reprodução, o controle de fatores abióticos e a manipulação de hormônios exógenos como a gonadotrofina coriônica humana (hCG), extrato hipofisário de carpa (EHC) e hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), são alternativas que vem sendo aplicadas com sucesso na tentativa de contornar os problemas de maturação final dos ovócitos, ovulação e desova em cativeiro (Zohar & Mylonas 2001).

Os hormônios exógenos podem ser aplicados por injeção intramuscular ou intraperitoneal, ou ainda na forma de peletes. São administrados em dosagem única, parcelada ou conjuntamente a inibidores dopaminérgicos (Weber et al. 2000; Shein et al. 2004; Aizen et al. 2005).

Alguns estudos com outros Scianidae como *Micropogonias undulatus*, *M. furnieri* e *Sciaenopsis ocellatus* utilizando hCG apresentaram sucesso na reprodução em cativeiro (Gwo et al. 1993; Lee 1997; García-Alonso & Vizziano 2004). Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do hCG na indução a maturação final dos gametas e desova de *M. americanus* em cativeiro.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os reprodutores foram capturados na Praia do Cassino, Rio Grande, Brasil (32°12'05S - 52°10'05W) com linha e anzol e transportados imediatamente para o Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha da Universidade Federal do Rio Grande.

A separação de machos e fêmeas foi realizada por massagem abdominal para verificação da extrusão de sêmen. Na ausência de gametas masculinos após a tentativa de extrusão, foi

realizada biopsia da gônada por punção através do poro urogenital com cânula flexível (650  $\mu\text{m}$  diâmetro interno). As amostras de ovócitos para biopsia foram mantidas em solução fisiológica (NaCl 0,9 %). O diâmetro dos maiores folículos (camadas envoltórias + ovócito) de cada fêmea foi medido em estereomicroscópio (n=10 folículos por fêmea). Apenas as fêmeas com folículos de diâmetros  $\geq 385 \mu\text{m}$  foram induzidas (García-Alonso & Vizziano 2004). A média do diâmetro dos folículos para indução foi de  $431 \pm 0,05 \mu\text{m}$ .

Cinco fêmeas de *Menticirrhus americanus* com peso de  $331,2 \pm 83,6\text{g}$  e comprimento total de  $31,2 \pm 3\text{cm}$  foram utilizadas nesse experimento. As fêmeas foram induzidas uma única vez, com injeção intramuscular na dosagem de  $300 \text{ UI hCG.kg}^{-1}$ . Após a indução as fêmeas foram mantidas em tanques individuais de 140 L, a  $23^\circ\text{C}$  e aeração suave, em uma sala climatizada sob fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro. Os machos não foram induzidos, pois sob leve massagem abdominal se apresentavam espermiantes. Todo o procedimento de manipulação dos reprodutores foi realizado com os animais anestesiados em banho de benzocaína (50 ppm) (protocolo ético de anestesia Rosalind Franklin University of Medicine and Science).

Para compor a avaliação do desempenho reprodutivo foi considerado o período de latência, taxa de fertilização, taxa de eclosão e fecundidade relativa. O período de latência correspondeu ao período entre a indução e a coleta dos ovócitos. Após 24 h da indução foi feita a primeira avaliação morfológica nas fêmeas. Verificando-se inchaço da região abdominal, dilatação e intumescimento da papila genital. Não apresentando essas condições, as fêmeas foram observadas em intervalos de 6 h. O momento ideal para extrusão dos ovócitos foi considerado quando o abdômen se encontrava distendido, macio e a papila genital intumescida. As fêmeas foram extrusadas apenas exercendo leve pressão no abdômen, certificando que os ovócitos

estavam maduros. Para a coleta dos gametas a região urogenital foi previamente limpa e seca com papel absorvente, evitando contaminação com urina e fezes.

Os gametas dos machos foram coletados antes dos gametas das fêmeas, para realização da fertilização artificial. O sêmen foi coletado com seringa de 1 mL e os ovócitos em um recipiente seco (200 mL). Para verificar a motilidade dos espermatozoides, uma amostra de sêmen foi ativada com água marinha e analisada em microscópio óptico. Os espermatozoides foram ativados com água do mar e gotejados sobre os ovócitos. A ativação dos espermatozoides foi realizada na seringa devido ao baixo volume ( $\approx 50 \mu\text{L}$ ) e alta viscosidade.

Os gametas foram gentilmente homogeneizados e deixados em repouso por 10min antes da lavagem para retirada do excesso de sêmen e do fluido ovariano. Em seguida foi verificada a flutuabilidade dos ovos e a taxa de fertilização. A flutuabilidade foi avaliada em proveta graduada com água do mar (30 ‰), verificando-se a proporção entre o volume de ovos supostamente viáveis (flutuantes) e os inviáveis (precipitados).

Uma amostra de ovos ( $n=100$ ) foi coletada (40 min após a fertilização) para verificar a segmentação em estágio de clivagem em 2 ou 4 células. A porcentagem de ovos segmentados foi utilizada para representar a taxa de fertilização. Dessa mesma amostra foi realizada a medida do diâmetro dos ovos ( $n=20$ ). A relação do número de ovos por mL foi estimada a partir da contagem de amostras de 0,5 mL de ovos de três fêmeas. A taxa de eclosão foi calculada a partir de amostras com aproximadamente 100 ovos retirados de cada desova e incubadas a 23°C. Após 30 h as larvas ( $n=10$ ) recém eclodidas, de cada amostra de desova, foram quantificadas e medidas.

## RESULTADOS

O período médio de latência foi de  $38,1 \pm 3,4$  h ( $876,3 \pm 78,2$  horas grau) e o diâmetro médio dos ovócitos utilizados para a indução foi de  $431,80 \pm 0,04$   $\mu\text{m}$ . Os ovos de papa-terra (Fig.1. A) são esféricos, transparentes, flutuantes e apresentam diâmetro médio de  $730 \pm 0,05$   $\mu\text{m}$ . As taxas de segmentação e eclosão foram  $63,8 \pm 14,5$  % e  $43,3 \pm 10,7$  %, respectivamente. A quantidade de ovos por volume de desova foi estimada em  $1.690 \pm 372$  ovos.mL<sup>-1</sup>. A fecundidade relativa variou de 40.080 a 294.000 ovos.kg<sup>-1</sup>. O método de indução empregado apresentou sucesso na maturação final e desova em 60 % das tentativas. O comprimento total das larvas recém eclodidas foi de  $2,2 \pm 0,2$  mm (Fig.1. C).

## DISCUSSÃO

O procedimento de indução hormonal é importante para a produção em escala comercial, pois acelera o processo de maturação dos ovócitos e sincroniza as desovas. Para as espécies que possuem baixa fertilidade (número de ovos produzido por fêmeas) a indução permite que a partir da sincronia das desovas se inicie uma produção comercial de larvas.

No presente trabalho a indução resultou em um período de latência semelhante ao descrito para outros Sciaenidae, onde foi constatada uma variação entre 24-30h a 25°C (600-750 horas-grau) e 48h a 20°C (960 horas-grau) para *M. furnieri* (300-500 UI hCG.kg<sup>-1</sup>) e *S. ocellatus* (500-600 UI hCG.kg<sup>-1</sup>), respectivamente (García-Alonso & Vizziano 2004; Colura 1990). O diâmetro mínimo dos folículos das fêmeas utilizadas para a indução no presente trabalho foi baseado no tamanho mínimo sugerido por García-Alonso & Vizziano (2004) para a indução de *M. furnieri*. Outros trabalhos com Sciaenidae mostraram diferentes valores mínimos de ovócitos para a indução a desova. Como por exemplo, *S. ocellatus*, *Cynoscion nebulosus* e *C. xanthulus*,



com diâmetro mínimo de 600, 400 e 440  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Cabrita et al. 2008). Neste estudo, os resultados obtidos, mostram que *M. americanus* pode ser induzido a desova com diâmetro mínimo de ovócitos por volta de 430  $\mu\text{m}$ .

A utilização dessa classe de diâmetro de ovócitos proporcionou resposta à desova de 60% das fêmeas induzidas com hCG e ovos fertilizados com valores de diâmetro médio um pouco inferior ao descrito por Colura (1990) para *S. ocellatus* que é de aproximadamente de 1.000  $\mu\text{m}$ , mas com valores próximos aos descritos para *Menticirrhus saxatilis*, 760-900 $\mu\text{m}$  (Welsh & Breder 1923).

O tratamento hormonal (hCG) em *S. ocellatus* resultou numa produção de 90.900 a 214.000 ovos.kg<sup>-1</sup> (Coluna 1990). Estes valores mostram que a produção estimada em *M. americanus* ocupa uma posição intermediária em relação a *S. ocellatus*.

A taxa de segmentação em *Micropogonias undulatus* induzidas a desova (500 UI hCG.kg<sup>-1</sup>) foi de 50% (Gwo et al. 1993) e para *M. americanus* alcançou 63%. Comparando-se os dados de segmentação apresentados, nas diferentes espécies, *M. americanus* demonstrou um resultado superior aquele encontrado para *M. undulatus*. Alguns estudos com reprodução de Sciaenidae (*Sciaenops ocellatus*, *Umbina cirrosa* e *M. undulatus*) apresentam resultados variados das taxas de eclosão, entre 12 e 42% (Sink et al. 2010; Gardes et al. 2000; Mylonas et al. 2004). Esses valores são semelhantes aos encontrados no presente trabalho para a taxa de eclosão média de 43% para *M. americanus*. O comprimento médio das larvas de *M. americanus* produzidas nos ensaios foi semelhante ao descrito para a espécie de mesmo gênero, *M. saxatilis* 2 -2,5 mm (Welsh & Breder 1923).

Esse estudo foi pioneiro na reprodução de *M. americanus* em cativeiro. Os resultados do trabalho mostraram que na dosagem de hCG 300 UI.kg<sup>-1</sup> pode ser utilizado com sucesso para a

indução da maturação final dos ovócitos de papa-terra, permitindo a produção de ovos fertilizados e larvas.

## LITERATURA CITADA

- AIZEN J, I MEIRI, I TZCHORI, B LEVAVI-SIVAN & H ROSENFELD. 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibitor. Gen. Comp. Endocr. 142: 212-221.
- CABRITA, E, V ROBLES, P HERRAEZ. 2008. Methods in reproductive aquaculture: Marine and freshwater species. CRC Press. (Taylor and Francis group) 547p.
- COLURA RL. 1990. Hormone induced strip-spawning of red drum. *In*: Red drum Aquaculture. Proceedings of a Symposium on the culture of red drum and others warm water fishes 1987. Texas A & M University Sea Grant College Program TAMU-56: 33-34.
- CRESWELL RL, CL OHS & CL MILLER. 2007. Candidate specie for Florida aquaculture: Atlantic croaker *Micropogonias undulatus*. University of Florida Institute of food and agriculture sciences. Fact Sheet FA 148 1-5.
- DONALDSON E. 1996. Manipulation of reproduction in farmed fish. Anim. Reprod. Sci. 42: 381-392.
- GARCÍA-ALONSO J & D VIZZIANO. 2004. Induction of oocyte maturation in the white croaker *Micropogonias furnieri* (Pisces: Sciaenidae) by human chorionic gonadotropin. Braz. J. Biol. 64, 73-80.
- GARDES L, P VILLANOVE, V BUCHET & C FAUVEL. 2000. Induced spawning of red drum *Sciaenops ocellatus*: use of multivariate and univariate analysis methods in the search for side effects of LH-RHa. Aquat. Living Resour. 13 (1): 19-27.

- GWO JC, K STRAWN, CR ARNOLD. 1993. Induced ovulation in Atlantic croaker (Sciaenidae) using hCG and an LHRH analog: A preliminary study. *Theriogenology* 39 (2): 353-361.
- HOLT GJ, CR ARNOLD & CM RILEY. 1990. Intensive culture of larval and post larval red drum. In: Red drum Aquaculture. Proceedings of a Symposium on the culture of red drum and others warm water fishes 1987. Texas A & M University Sea Grant College Program TAMU-56: 53-56.
- LEE C. 1997. Marine finfish hatchery technology in the USA – status and future. *Hydrobiologica* 358: 45-54.
- MENEZES N & J FIGUEIREDO. 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV Teleostei (3). São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo 96p.
- MIRANDA FILHO, K, R ROBALDO & W WASIELESKY. 2004. Tolerância de juvenis do papa-terra *Menticirrhus littoralis* (Holbrook, 1860) (Pisces:Sciaenidae) a baixas salinidades. *Atlântica* 30(2): 101-106.
- MYLONAS C, Y KYRIAKOU, I SIGELAKI, G GEORGIU, D Stephanou & P DIVANACH. 2004. Reproductive biology of the shi drum (*Umbrina cirrosa*) in captivity and induction of spawning using GnRH $\alpha$ . *Isr. J. Aquacult.* 56(2): 75-92.
- PROTOCOLO ÉTICO DE ANESTESIA ROSALIND FRANKLIN UNIVERSITY OF MEDICINE AND SCIENCE. Acesso website: <http://rosalindfranklin.edu/dnn/home/research/animal/guidelines/tabid/763/default.aspx>
- SHEIN N, H CHUDA, T ARAKAWA, K MIZUNO & K SOYANO. 2004. Ovarian development and final oocyte maturation in cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fisheries Sc.* 70(3): 360-365.

- SINK T, RJ STRANGE & RT LOCHMANN. 2010. Hatchery methods and natural, hormone-implant-induced, and synchronized spawning of captive Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) Linnaeus 1766. *Aquaculture* 307 (1): 35-43.
- WEBER GM, WV KING, RW CLARK, RG HODSON, CV SULLIVAN. 2000. Morpho-physiological predictors of ovulatory success in captive striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture* 188: 133-146.
- WELSH WW & CM BREDER. 1923. Contributions to life histories of Sciaenidae of the Eastern United States coast. *Fish.B- NOAA* 39: 141 – 201.
- ZOHAR Y. & C MYLONAS. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99-136.

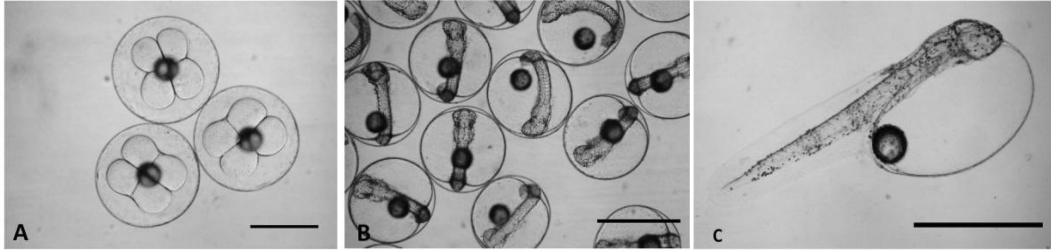


Figura 1: Estágios embrionários e larva recém eclodida de papa-terra *Menticirrhus americanus*, produzidos sob indução com hCG (300 UI/Kg). **A** – Início da segmentação em 4 células, 45min após fertilização (barra = 470  $\mu$ m), **B** - Embrião em estágio de nêurula, 22h após fertilização (barra = 730 $\mu$ m) e **C** - Larva recém eclodida (barra = 840  $\mu$ m ).

## CAPÍTULO 3

(Modelo Revista: Aquaculture)

### **Induction of final oocyte maturation and artificial fertilization of Southern Kingfish**

#### ***Menticirrhus americanus* using different dosages of hCG**

Cintia Labussiere Nakayama<sup>a</sup>, Luís André Sampaio<sup>a</sup>, Ricardo Berteaux Robaldo<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, CP 474, CEP 96201-900 - Rio Grande – Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CP 354, CEP 96001-970 – Pelotas – Brazil

#### **ABSTRACT**

The Sciaenidae Southern kingfish *Menticirrhus americanus* is an important fishery resource in South America and it is highly appreciated by anglers. Mature fish were captured in coastal Southern Brazil during the spawning season and administered different dosages of hCG to evaluate its effectiveness for final oocyte maturation induction and artificial fertilization. Fish received a single intramuscular injection of 300 (n = 11), 600 (n = 10), or 900 (n = 12) IU hCG.kg<sup>-1</sup> and the overall reproductive performance was followed. Independently of the dosage, hCG proved successful for final maturation induction, the resulting percentage of ovulating females induced with 300, 600, and 900 IU hCG.kg<sup>-1</sup> was respectively equal to 45, 60 and 41%. However, two females aborted when they were treated with the higher hCG dosage. No significant difference was found for relative fecundity. Fertilization (73%) and hatching percentage (50%) were also higher for females treated with the intermediate dosage. The latency period was shorter (34 h) for females injected with 600 and 900 IU hCG.kg<sup>-1</sup>. And females treated with 300 IU hCG.kg<sup>-1</sup> resulted in larger larvae. Larval production with 600 IU hCG.kg<sup>-1</sup>

(39,000 larvae) was higher than the lowest dosage tested. The results of this study point to the effectiveness of hCG for induction of final maturation in *M. americanus*, and considering the overall reproductive performance, the intermediate dosage tested (600 IU hCG.kg<sup>-1</sup>) should be used.

**Keywords:** Sciaenidae, reproduction, egg, larvae

## INTRODUCTION

The Southern kingfish *Menticirrhus americanus* is a Sciaenidae and it is distributed along the continental shore and estuaries from Argentina to the USA (Menezes and Figueiredo, 1980). This species is appreciated by sport fishing and the quality of its flesh (Smith and Wenner, 1985; Braun and Fontoura, 2004). Based in macro and microscopic gonad analysis, the reproductive season of Southern kingfish occurs from spring to autumn in the South of Brazil (Haluch et al., 2011).

The success of world aquaculture can be partially attributed to capacity to the control reproduction in captivity, either by manipulation of temperature and photoperiod, or by hormonal therapy (Mylonas et al., 2010). Hormonal intervention is considered the most effective method to induce final oocyte maturation and to synchronize spawning for several fish species in captivity (Zohar and Mylonas, 2001). Final maturation has been induced through hormonal therapy for several Sciaenidae species, and the hormones (hCG purified human Chorionic Gonadotropin and LHRHa: Luteinizing Hormone-Releasing Hormone analogue) and dosages used can vary widely: *Micropogonias furnieri* 300 IU hCG.kg<sup>-1</sup>, *Micropogonias undulates* 500 IU hCG.kg<sup>-1</sup>, *Cynoscion nebulosus* 1,100 IU hCG.kg<sup>-1</sup>, *Sciaenops ocellatus* 20 - 50 µg LHRHa.kg<sup>-1</sup>, *Micropogonias*

*undulates* 100 µg LHRHa.kg<sup>-1</sup>, *Umbrina cirrosa* 10 mg LHRHa.kg<sup>-1</sup> (Gwo et al., 1993; Colura et al., 1988; García-Alonso and Vizziano, 2004; Mylonas et al., 2004).

The hormonal dosage seems to be species-specific. Particularly, the hCG has been successfully applied and the reasons of this success can be attributed to the long half-life of hCG and its capacity to bind to the Luteinizing Hormone (LH) receptor (Mañanós et al., 2009).

As far as the authors are concerned, there are no studies on the reproduction of *M. americanus* in captivity. Hence, this paper evaluates the efficacy of different dosages of hCG to induce final oocyte maturation on wild captured *M. americanus* broodstock.

## **MATERIALS AND METHODS**

Sixty-six mature Southern kingfish (females: weight 128.1 ± 75.8 g and total length 23.3 ± 3.7cm; males: weight 154.9 ± 24g and total length 25.7 ± 1.1cm) were captured by hook and line in Cassino Beach, South Brazil (32°12'05"S-52°10'05"W) during the reproductive season. Once captured, fish were kept in oxygenated tanks and thereafter transported by truck to the Laboratory of Marine Fish Culture of the Federal University of Rio Grande – FURG (Rio Grande, Brazil).

Fish were placed in 1,000L tanks and final maturation was induced the same day of the capture. Fish were anesthetized with benzocaine (50ppm) during all steps of the experiment.

Males were easily identified as running milt was obtained after gentle abdominal pressure, while the sex of females was confirmed by intraovarian biopsy with a flexible catheter (0.65mm internal diameter). Oocyte samples (follicle + oocytes) were observed and the largest ones (n=10) were measured on a stereoscopic microscope. Preliminary trials showed final maturation of oocytes ≥ 385 µm can be successfully achieved with hCG induction.



Females were treated with a single intramuscular injection of hCG (Choragon, Ferring Pharmaceuticals - São Paulo - Brazil). Three dosages were evaluated: 300 (n=11), 600 (n=10) and 900 (n=12) IU hCG.kg<sup>-1</sup>. After the treatment, females were kept individually in a tank filled with 100L of seawater (temperature 23°C and salinity 30). They were observed closely for signs of abdominal swelling starting 24 h after the injection, if females were not ready for stripping at this time, they were checked again 30 h after the injection and every 2 h thereafter, until 40 h, when females were discarded. Females with a swollen abdomen were considered ready for stripping. The period between induction and stripping was considered the latency period. Males were not induced because semen could be easily striped during the breeding season.

Once a female was considered ready for stripping, semen from one male was collected with a syringe (1 mL). A small sample of the semen was activated with seawater and checked for motility before artificial fertilization was performed. Due the low volume ( $\approx 50\mu\text{L}$ ) and viscosity the sperm were activated in syringe.

Hand striped oocytes were collected in a bowl and semen recently activated with seawater was added. The gametes were gently homogenized, hydrated and washed in seawater to remove excess semen and ovarian fluid. The volume was calculated as the sum of floating eggs and sinking eggs deposited on the bottom and it was measured in a graduated cylinder.

A sample of approximately 100 floating eggs were examined for blastomer segmentation 45 minutes after fertilization under microscope, they were considered fertilized if they reached the 2-4 cells stage. The segmentation percentage was used to represent the fertilization rate.

Three samples of 1 mL of eggs were counted to estimate the number of eggs per mL. Then, the total fecundity (eggs per female) was estimated by eggs mL<sup>-1</sup> multiplying by total eggs

volume per female. And the relative fecundity (eggs.kg<sup>-1</sup>) was estimated by eggs mL<sup>-1</sup> multiplying by total eggs volume by each female weight (kg).

A second sample of approximately 100 floating eggs was collected and kept (temperature 23°C and salinity 30) until the larvae hatching to determine the hatching rate.

The fecundity (total and relative), rates (fertilization and hatching) and estimated larval produced were calculated using the formulae:

$$\text{Total fecundity} = (\text{number of eggs mL}^{-1} * \text{volume of spawned eggs})$$

$$\text{Relative fecundity} = (\text{number of eggs mL}^{-1} * \text{volume of floating eggs}) / (\text{female weight})$$

$$\text{Fertilization rate (\%)} = (\text{number of eggs segmented} / \text{total number of eggs counted}) * 100$$

$$\text{Hatching rate (\%)} = (\text{larvae hatching} / \text{total number of eggs}) * 100$$

$$\text{Larval production} = \text{relative fecundity} * (\text{fertilization rate} / 100) * (\text{hatching rates} / 100)$$

Fertilized eggs diameter, larval total length, and yolk sac diameter (n=10) were measured with a stereoscopic microscope.

Results were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Test of Duncan. Percentage data were transformed in arc-sin square root before analysis, only untransformed data are shown. Differences were considered significant at  $\alpha = 0.05$ .

## RESULTS

hCG was effective to induce final maturation of *M. americanus* at all concentrations tested and artificial fertilization was also possible. Weight and total length of females used in this experiment were similar ( $P > 0.05$ ) among treatments (Tab. 1), and as such, eventual differences on reproductive performance are not likely to be linked to the broodstock used, and should be accounted for the dosages of hCG used.

Oocyte diameter measured before final maturation were presented difference ( $P>0.05$ ) among the three different dosages (Tab. 1).

The influence of hCG concentration on reproductive traits is summarized in Table 2 and described below. Fertilization rate was significantly higher in dosage of  $600 \text{ IU.kg}^{-1}$ . No difference was found to hatching rates among the three treatments ( $P>0.05$ ) (Tab.2). Values of spawning rate were 41.7, 45.5 and 60.0% to 900, 300 and  $600 \text{ IU hCG.kg}^{-1}$ , respectively. Two of the females in the  $900 \text{ IU hCG.kg}^{-1}$  had gonads partially prolapsed.

Relative fecundity did not vary significantly among treatments. Morphological changes are part of final maturation, such as abdominal swelling, which plays an important feature to determinate at the end of the latency period. Females treated in low dosage of hCG took longer latency period than the higher dosages ( $P<0.05$ ).

Results of reproductive performance showed larger eggs in low hCG treatment than in intermediate dosage ( $600 \text{ UI kg}^{-1}$ ) ( $P<0.05$ ). And smaller larvae in two highest hCG dosages ( $P<0,05$ ) (Tab.2). However, these smaller larvae showed larger yolk sac diameter ( $P<0.05$ ). Larval production was higher in dosage intermediate ( $P<0.05$ ).

## DISCUSSION

Total length of females used in the present study presented was larger (22.7 - 23.9cm) than the minimum size at first maturity of (17cm - length at 50% maturity -  $L_{50}$ ) determined for wild *M. americanus* (Haluch et al., 2011). The single dosage of hCG and the oocyte diameter  $\geq 400\mu\text{m}$  used to induced final maturation were successful in the three dosages tested. In *Umbrina cirrosa*, as well as in others Sciaenidae, *M. furnieri* and *Argyrosomus hololepidotus* the minimum size of oocytes to induction to final maturation were 410, 400 and  $515\mu\text{m}$ , respectively

(Barbaro et al., 2002, García-Alonso and Vizziano, 2004, Battaglione and Talbot, 1994). Unlike to pre-vitellogenic oocytes growth, the vitellogenic oocytes growth are gonadotropin regulated, which explains relevance to minimum size of oocytes to final maturation.

Regardless of the dosage applied the fertilized egg diameter ranged from 676 to 709 $\mu\text{m}$  and the eggs are spherical shape, transparent and present one oil droplet. The egg size of *M. americanus* is in accordance to the size described to Sciaenidae eggs, which diameter range from 600 to 1,300 $\mu\text{m}$  (Thomas et al., 1995). However, comparing to *Menticirrhus saxatilis* the values of egg diameter was described range from 800 to 850 $\mu\text{m}$  (Welsh and Breder, 1923) showing slight larger than to *M. americanus*.

Relative fecundity of *Cynoscion nebulosus* (258,000 eggs.kg<sup>-1</sup>) was estimated using two different methods; 1) estimation of the number of oocytes in the most advanced stage (largest) modal group of oocytes and 2) estimation of number of oocytes spawned from females hCG induced, and no significant differences was found between methods to estimate the relative fecundity (Colura et al., 1988).

Castillo (1986) using the estimation of the number of oocytes in the most advanced stage (largest) modal group of oocytes estimated the relative fecundity to *M. americanus* (43,450 - 63,000 eggs.kg<sup>-1</sup>), for females which total length ranged 21-25 cm. These values were lower than the relative fecundity showed in the present study. But, the wide relative fecundity in the present study may not be significantly different to values found to Castillo (1996).

García-Alonso and Vizziano (2004) found different time to response for final maturation in different hCG dosages (100-500 IU of hCG.kg<sup>-1</sup>). It meant shorter latency period in increased hCG dosage and longer latency period in lower hCG dosage. The same response is showed in the

present work, short latency period in 600 and 900 IU of hCG.kg<sup>-1</sup> treatments and longer latency period in 300 IU of hCG.kg<sup>-1</sup>.

According to Brooks et al. (1997) larger eggs spent more time to larva hatching and also this larva is larger, what happened in the 300 IU of hCG.kg<sup>-1</sup> treatment. Besides at laboratory conditions larger larvae are desired because can be fed with large particles, considering the difficult to produce small feed (Planas and Cunha, 1999). These larger larvae originated from females treated with low hCG dosage were large because the hatching time was longer, and as such they were allowed more time to develop, compared to larvae from the others treatment. Correspondingly, these larger larvae presented the smallest yolk-sac diameter among the three dosages of hCG tested.

Although the hCG has been successfully applied in different fish species for final maturation induction, some authors consider losses of hormone efficiency due to an immune response (Zohar and Mylonas, 2001). However, antibodies were not detected in two Cyprinidae (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Carassius aurata*) treated with hCG over several years (Van Der Kraak et al., 1989). These authors suggested that hCG may be less antigenic in fish than suggested.

The results of this study point to the effectiveness of hCG for induction of final maturation in *M. americanus*. It is recommended to use the intermediate dosage tested (600 IU hCG.kg<sup>-1</sup>) in order to improve the overall reproductive performance, including the estimated number of larvae produced.

## REFERENCES

- Barbaro, A., Francescon, A., Bertotto, D., Bozzato, G., Di Maria, I., Patarnello, P., Furlan, F., Colombo, L., 2002. 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. J. Appl. Ichthyol. 18, 192-199.
- Battaglione, S.C., Talbot, R.B., 1994. Hormone induction and larval rearing of mullet, *Argyrosomus hololepidotus* (Pisces: Sciaenidae). Aquaculture 126, 73-81.
- Brooks, S., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? Rev. Fish Biol. Fisher. 7, 387-416.
- Castillo V. R. A. 1986 Estudo sobre a biologia e ciclo de vida de *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) (Ubatuba 23°30'S – Cananéia 25°05'S São Paulo. Master thesis, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, Brazil, 150pp.
- Colura, R.L., Maciorowski, A.F, Henderson-Arzapalo, A., 1988. Gonadal maturation, fecundity, and strip-spawning of female spotted seatrout. Proc. Annu. Conference Southern Association Fisheries and Wild Agencies 42, 80-88.
- García-Alonso, J., Vizziano, D., 2004. Induction of oocyte maturation in the white croaker *Micropogonias furnieri* (Pisces: Sciaenidae) by human chorionic gonadotropin. Braz. J. Biol. 64, 73-80.
- Gwo, J.C., Strawn, K., Arnold, C.R., 1993. Induced ovulation in Atlantic croaker (Sciaenidae) using hCG and an LHRH analog: A preliminary study. Theriogenology, 39 (2) 353-361.
- Haluch, C.F., Abilhoa, V., Freitas, M.O., Corrêa, M.F.M., Hostim-Silva, M., 2011. Estrutura populacional e biologia reprodutiva de *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758)

- (Teleostei, Sciaenidae) na baía de Ubatuba-enseada, Santa Catarina, Brasil. Biotemas 24, 47-59.
- Mañanós, E., Dunca, N., Mylonas, C., 2009. Reproduction and control of ovulation and spawning in cultured fish. In: E. Cabrita, V. Robles and P. Herráez (Ed.), Methods in Reproductive Aquaculture, Marine and Freshwater Species. CRS Press, Boca Raton, pp. 3-80.
- Menezes, N., Figueiredo, J., 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV Teleostei (3). São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 96p.
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. Gen. Comp. Endocr. 165(3), 516-534.
- Mylonas, C.C., Kyriakou, Y., Sigelaki, I., Georgiou, G., Stephanou, D., Divanach, P., 2004. Reproductive biology of the shi drum (*Umbrina cirrosa*) in captivity and induction of spawning using GnRH $\alpha$ . Isr. J. Aquacult.-Bamid 56, 75-92.
- Planas, M., Cunha, I., 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. Aquaculture 177, 171-190.
- Protocolo ético de anestesia Rosalind Franklin University of Medicine and Science. Institutional Animal Care and use Committee. Acesso website: <http://rosalindfranklin.edu/dnn/research/animal/guideines/tabid/763/default.aspx>
- Smith, J., Wenner, C., 1985. Biology of the southern kingfish in the South Atlantic Bight. Trans. Am. Fish. Soc. 114, 356-366.
- Thomas, P., Arnold, C.R., Holt, G.J., 1995. Red drum and others sciaenids. in: Bromage, N., Roberts, R.J., (Eds.) Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell Science, Oxford, pp. 118-137.

Van Der Kraak, G., Pankhurst, N.W., Peter, R.E., Lin, H.R., 1989. Lack of antigenicity of human chorionic gonadotropin in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture* 78, 81-86.

Welsh, W.W., Breder, C.M., 1923. Contributions to life histories of Sciaenidae of the Eastern United States coast. *Bull. U.S. Bur. Fish.* 39,141-201.

Zohar, Y., Mylonas, C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197(1), 99-136.



Table 1. Means ( $\pm$  SD) of body weight, total length and oocyte diameter of *Menticirrhus americanus* treated with different hCG dosages.

Treatment	300 IU hCG kg <sup>-1</sup>	600 UI hCG kg <sup>-1</sup>	900 UI hCG kg <sup>-1</sup>
Weight (g)	138 $\pm$ 63 <sup>a</sup>	109 $\pm$ 49 <sup>a</sup>	138.4 $\pm$ 100.1 <sup>a</sup>
Total length (cm)	23.3 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	22.7 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	23.9 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>
Oocytes diameter ( $\mu$ m)	408 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	402 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	399 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>

\*Different letters in the same line represent significant difference. (P<0.05).

Table 2: Overall spawning and larvae performance of *Menticirrhus americanus* from different hCG treatment.

Treatment (IU hCG kg <sup>-1</sup> BW)	300 (n = 11)	600 (n = 10)	900 (n = 12)
<b>Reproductive performance</b>			
Latency period (h)	39.5 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	34.4 $\pm$ 8.0 <sup>b</sup>	34.0 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>
Spawning rate (%)	45.5	60.0	41.7
Fertility rate (%)	37.8 $\pm$ 9.9 <sup>b</sup>	73.0 $\pm$ 19.7 <sup>a</sup>	53.2 $\pm$ 24.5 <sup>b</sup>
Eggs per female	10,556 $\pm$ 8,643 <sup>a</sup>	11,702 $\pm$ 10,781 <sup>a</sup>	19,142 $\pm$ 22,632 <sup>a</sup>
Relative fecundity (eggs.kg <sup>-1</sup> )	60,770 $\pm$ 35,593 <sup>a</sup>	90,193 $\pm$ 53,403 <sup>a</sup>	85,614 $\pm$ 59,355 <sup>a</sup>
Egg diameter ( $\mu$ m)	709.1 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	676.8 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	688.7 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>
Hatching rate (%)	25.6 $\pm$ 15.1 <sup>a</sup>	50.0 $\pm$ 22.0 <sup>a</sup>	29.1 $\pm$ 26.6 <sup>a</sup>
<b>Larvae</b>			
Number of Larvae	5,886 $\pm$ 5,372 <sup>b</sup>	39,000 $\pm$ 26,120 <sup>a</sup>	14,898 $\pm$ 10,637 <sup>b</sup>
Larval length (mm)	2.02 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.73 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	1.87 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
Yolk sac diameter (mm)	0.69 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.83 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>

Superscripts with different letters in the same line represents (mean  $\pm$  SD) significant difference (P<0.05).

## CAPÍTULO 4

(Modelo Revista: Aquaculture)

### **Caracterização, resfriamento e criopreservação do sêmen de papa-terra *Menticirrhus americanus* com DMSO**

Cintia L. Nakayama<sup>a</sup>, Gabriel B. Martins<sup>a</sup>, Ricardo V. Rodrigues<sup>a</sup>, Denise C. Bongalhardo<sup>b</sup>, Luis A. Sampaio<sup>a</sup>, Ricardo B. Robaldo<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, CP 474, CEP 96201-900 - Rio Grande – Brasil

<sup>b</sup> Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CP 354, CEP 96001-970 – Pelotas – Brasil

#### **RESUMO**

As informações da biologia reprodutiva da espécie, como as características do sêmen, vêm sendo utilizadas na aquicultura para avaliação da qualidade dos reprodutores. Essas informações podem ser utilizadas para avaliar a qualidade do sêmen preservado. O sêmen de *M. americanus* foi coletado a partir dos testículos para avaliação das características e apresentou valores de osmolalidade  $370 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ , espermátocrito 88%, pH 6,9 e densidade espermática de  $9,9 \times 10^9$  espermatozóides  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente, no período reprodutivo. A motilidade dos espermatozóides para todas as amostras foi iniciada em solução  $300 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ . O sêmen mantido resfriado ( $5^\circ\text{C}$ ) ficou ativo até 15h quando extrusado e 6h quando mantido no testículo. Após o descongelamento as amostras utilizando 5, 10 e 20% de DMSO mantiveram a mesma motilidade espermática. Os resultados caracterizaram o sêmen do papa-terra e determinaram protocolos eficientes para sua conservação por resfriamento ou criopreservação em nitrogênio

líquido. Técnicas que servirão como ferramenta para estudos futuros sobre o potencial de *M. americanus* na aquicultura.

## **ABSTRACT**

Knowledge of the reproductive biology, such as semen characteristics, has been used to evaluate broodstock quality in aquaculture. This information can be use to evaluate the sperm preserved. The semen of *M. americanus* was collected from testis to evaluate the characteristics and showed osmolality 370 mOsm.kg<sup>-1</sup>, spermatocrit 88%, pH 6.9 and sperm density 9.9 x 10<sup>9</sup> spermatozoa mL<sup>-1</sup> in reproductive season. Spermatozoa motility for all samples began at 300 mOsm.kg<sup>-1</sup>. The semen refrigerated storage (5°C) retained motility for up to 15 h when extruded and 6 h within testis, respectively. Cryoprotectant at 5, 10 and 20 % DMSO post thawed sustained the same motility. These results show semen characteristics, chilled storage and cryopreservation protocols that could be used as tool for future study on *M. americanus* as potentially to aquaculture.

## **INTRODUÇÃO**

O Sciaenidae papa-terra *Menticirrhus americanus* é amplamente distribuído ao longo da costa Oeste do Atlântico, desde a Argentina até os EUA (Menezes e Figueiredo, 1980). Essa espécie apresenta características desejáveis para a aquicultura como o fato de ser eurialina e de sua carne ser saborosa e apreciada pelo consumidor. Mas para a espécie ser eleita na aquicultura são necessárias informações da biologia reprodutiva e técnicas que permitam avaliar a qualidade desses reprodutores.

Parâmetros da densidade espermática, pH do plasma seminal, tempo de motilidade, porcentagem de motilidade, osmolalidade do sêmen, entre outros, tem sido utilizados para avaliar a capacidade reprodutiva das espécies (Cabrita et al., 2009, Lanes et al., 2010).

Embora esses parâmetros sejam utilizados para medir qualidade espermática, o tempo de motilidade (medido pelo intervalo de tempo entre o início e o término do deslocamento) e a porcentagem de células móveis (escore) são considerados os parâmetros mais importantes porque deles dependem a capacidade de encontro com o ovócito para a fertilização (Rurangwa et al., 2004). Os parâmetros de qualidade espermática como motilidade (tempo e escore) pode ainda ser aplicado às técnicas de biotecnologia para melhoramento na produção em cativeiro, seleção de reprodutores, banco de material genético e conservação de estoques (Tiersch et al., 2004).

O resfriamento e a criopreservação do sêmen surgem como alternativas ao método tradicional de reprodução com a presença de machos e fêmeas. Essas técnicas de armazenamento permitem a pronta utilização do sêmen no volume e na concentração necessários para a fertilização e ainda sem a necessidade de manter os machos no laboratório.

O armazenamento do sêmen de peixes sob refrigeração (1 - 5°C) pode garantir sua viabilidade por horas ou dias sem perda de qualidade, por outro lado a criopreservação permite que esse tempo se prolongue por um período de longos anos (Tiersch et al., 2004).

Embora a técnica de criopreservação seja aplicada com sucesso no sêmen de diferentes espécies de peixes, os protocolos e procedimentos variam, como por exemplo, as soluções diluidoras e os tipos de crioprotetores utilizados bem como suas concentrações (Suquet et al., 2000, Tian et al., 2008).

O presente estudo tem por objetivo descrever as características do sêmen e aplicar as técnicas de resfriamento e criopreservação do sêmen em *M. americanus*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Reprodutores**

Machos de *M. americanus* em média ( $\pm$  DP) pesando 181g ( $\pm$  60) e medindo 26,8 cm ( $\pm$  2,5) (peso total e comprimento total, respectivamente) foram capturados com linha e anzol na praia do Cassino (RS) (32°12'05"S - 52°10'05"O) no período reprodutivo (verão) e aclimatados em tanques de 300L a 24°C, até o início das coletas (sêmen e gônadas) que ocorreu até 24h após a captura. Devido ao baixo volume de sêmen produzido ( $\approx$  50  $\mu$ L), as amostras de sêmen foram coletadas diretamente das gônadas dissecadas.

Previamente os animais foram anestesiados em água com gelo (protocolo ético de anestesia Rosalind Franklin University of Medicine and Science) para insensibilização, secos com papel toalha para então as gônadas serem removidas. Para compor o índice gonadossomático (IGS) as gônadas foram pesadas.  $IGS = (\text{peso das gônadas}/\text{peso total}) \cdot 100$ . Os testículos removidos foram mantidos em placa de Petri e mantidos resfriados em caixa térmicos.

### **Caracterização dos Testículos e do Sêmen**

Onze machos selvagens de *M. americanus* foram utilizados para composição das características do sêmen.

Para avaliação da motilidade espermática (tempo de motilidade e escore) as observações foram feitas em microscópio óptico (aumento 100x) com amostras diluídas em solução ativadora de 900 mOsm.kg<sup>-1</sup> NaCl (2  $\mu$ l de sêmen e 10  $\mu$ l de solução de NaCl, pH 7,4).

O tempo de motilidade foi medido usando cronômetro e o escore utilizando uma escala arbitrária da porcentagem de células em deslocamento. O tempo de motilidade correspondeu ao intervalo de tempo entre o início e o final do deslocamento dos espermatozóides, não sendo considerado o movimento vibratório. O escore variou de 0-5, sendo escore 0 para ausência de deslocamento e escore 1 quando 1-25% dos espermatozóides se deslocavam, 2, 26 – 50%, 3, 51 – 75%, 4, 76 – 90% e 5, 91 – 100% (Borges et al., 2005).

Os espermatozóides foram fixados em formalina 4% e diluídos em solução diluidora (1:1000 – solução de 200 mOsm.kg<sup>-1</sup> NaCl, pH 7.25) para posterior análise. A densidade espermática foi determinada pela contagem em câmara de contagem (Neubauer). Antes da contagem as amostras homogeneizadas foram deixadas em repouso por 10 min. para sedimentação das células.

A determinação do espermatócritos foi realizada em centrífuga de microhematócrito. Para cada amostra dois capilares foram preenchidos com sêmen, vedados com massa de modelar e centrifugados por 60 min em 12.000 g. A osmolalidade e pH foram medidos utilizando amostras de 10 µl de sêmen, cada.

A osmolalidade foi analisada em osmômetro por pressão de vapor (VAPRO 5520 Wescor, Inc.; Logan, Utah, EUA) e o pH medido com fitas de teste de pH variando de 6-8 (com intervalos de 0,2 - Macherey-Nagel; Düren, Alemanha).

O teste de ativação dos espermatozóides foi feito em soluções de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 e 900 mOsm.kg<sup>-1</sup> de NaCl. As soluções foram preparadas a partir de uma solução matriz 900 mOsm.kg<sup>-1</sup> de NaCl com incremento de água dionizada até as soluções alcançarem osmolalidades desejadas finalizando em 100 mOsm.kg<sup>-1</sup>.

Para análise histológica dos testículos foram utilizados oito *M. americanus*. As amostras de tecidos seccionados foram fixadas em Bouin por 4 h, após esse período foram transferidas para conservação em álcool etanol 70% até processamento. O processamento inicial foi de desidratação em séries de etanol (LUPE PT 05 – Lupetec; São Carlos - São Paulo - Brasil) e seguido de inclusão em Paraplast® (Mc Cormick Scientific; St. Louis - Missouri - E.U.A.), seccionadas (4 µm) em micrótomo (LUPE MRP 03 - Lupetec - São Carlos - São Paulo - Brasil). Os cortes histológicos foram corados em hematoxilina-eosina (H-E). As lâminas foram examinadas em microscópio (Olympus BX 45 - Olympus America Inc.; Center Valley - Pennsylvania - E.U.A.) dotado de câmera (Olympus DP 72 – Olympus America Inc.; Center Valley - Pennsylvania - E.U.A.) para captura das imagens.

## **RESFRIAMENTO**

O teste de resfriamento foi realizado com amostras coletadas de quatro peixes. Antes do resfriamento foi aplicado um teste de motilidade (tempo e escore) (2 µL sêmen: 10 µL 900 mOsm.kg<sup>-1</sup>, pH 7.34) considerando esse teste o tempo zero. A mesma escala de escore utilizada na caracterização do sêmen foi aplicada para o resfriamento.

O testículo bilobado foi separado ao meio e uma das metades foi armazenada em tubo Falcon e a outra metade submetida a extrusão (leve pressão sobre a gônada). O sêmen extrusado foi transferido para tubo Falcon, sendo todos armazenados a 5°C. A cada 3 h as amostras foram testadas para verificar a motilidade.

## **CRIOPRESERVAÇÃO**

Onze peixes foram utilizados no teste de criopreservação de sêmen. Os testículos foram removidos e mantidos em placa de Petri para a coleta de sêmen. O sêmen fresco coletado foi analisado para certificação de que não houve ativação durante a coleta. Não constatada a ativação o sêmen foi submetido a teste de motilidade (2  $\mu\text{L}$  sêmen: 10  $\mu\text{L}$  900  $\text{mOsm.kg}^{-1}$ , pH 7.34) para posterior comparação com o sêmen descongelado.

O dimetil sulfóxido (DMSO) foi utilizado como crioprotetor nas concentrações 5, 10 e 20%. Soluções de DMSO 10, 20 e 40% foram preparadas e armazenadas a 5°C. O sêmen foi diluído em solução diluidora 1:1 e uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  (sêmen + solução diluidora) da diluição foi adicionada a 100  $\mu\text{L}$  de crioprotetor, nas devidas concentrações de DMSO. A solução foi homogeneizada em microtubos antes do preenchimento das palhetas (250  $\mu\text{L}$ ). Para cada macho foram feitas no mínimo duas palhetas para cada concentração e o fechamento das palhetas foi feita com massa de modelar.

A criopreservação do sêmen foi realizada sem realização do tempo de equilíbrio, mas com a curva de congelamento descrita por Chen et al. (2004). Para curva de congelamento foi utilizada uma estante flutuante com dois diferentes níveis acima do nitrogênio líquido. As palhetas foram dispostas em posição horizontal na estante a 6 cm acima da superfície do nitrogênio líquido por 10 min e depois transferidas para altura de 1cm por 5 min e por conseguinte submergidas diretamente em nitrogênio líquido. Esse processo foi realizado em isopor e depois as palhetas foram transferidas para armazenamento em botijão de nitrogênio líquido até o momento do descongelamento.

Após dois meses criopreservadas as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 36°C por 15s para verificar a motilidade e integridade de membrana. Para liberação do sêmen



uma das pontas da palheta foi cortada e o sêmen liberado foi colocado em microtubos e homogeneizado.

O teste de integridade de membrana foi realizado sob análise colorimétrica por fluorescência com kit Live/Dead (SYBR e Propidium Iodide- PI, Molecular Probes; Eugene - Oregon - E.U.A.). A alíquota da amostra descongelada de sêmen (5  $\mu$ L) foi diluída em SE (500  $\mu$ L), homogeneizada e recebeu adição de SYBR 14 (3  $\mu$ L) e PI (1  $\mu$ L) sendo incubadas por 15 min., no escuro. As células vivas (membrana íntegra) foram coradas de verde pela presença do corante SYBR 14 e células mortas (membrana danificada) coradas de vermelha pela incorporação de PI. A integridade de membrana das amostras foi analisada em microscópio de epifluorescência sob aumento de 400 x e excitação por UV-2A (330-380 nm; DM 400; BA: 420). A viabilidade dos espermatozóides foi calculada pela porcentagem de células vivas em relação ao número total de células contadas.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados do tempo de motilidade foram comparados com análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Para comparação dos escores foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com significância de 95% ( $P < 0,05$ ). Os dados de porcentagem foram transformados utilizando a função arco-seno da raiz quadrada, apenas os dados não transformados são apresentados em figuras e tabelas. Para verificar a correlação entre o número de espermatozóides e espermatócrito e entre espermatozóides vivos e motilidade (escore) foi realizada análise de regressão linear de Pearson.

## RESULTADOS

### Caracterização dos Testículos e do Sêmen

Os testículos de *M. americanus* são lobulares do tipo cístico (não restrito), bilobados e localizados na região dorsal da cavidade abdominal. A média ( $\pm$ DP) do IGS para o período reprodutivo foi de 1,9 % ( $\pm$  0.4) e os cortes histológicos permitiram verificar diferentes fases espermatogênicas (Fig.1) para o período.

Os resultados (média  $\pm$ DP) da osmolalidade do sêmen foi de  $370 \pm 45$  mOsm.kg<sup>-1</sup>, o espermatócrito foi igual a  $88 \pm 12$  %, a densidade de espermatozóides foi de  $9,9 \pm 2,3 \times 10^9$  espermatozóides mL<sup>-1</sup> e o pH foi igual a  $6,9 \pm 0,1$ . A correlação entre o número de espermatozóides e espermatócrito não foi significativa ( $r^2 = 0.2229$ ,  $P = 0.1212$ ).

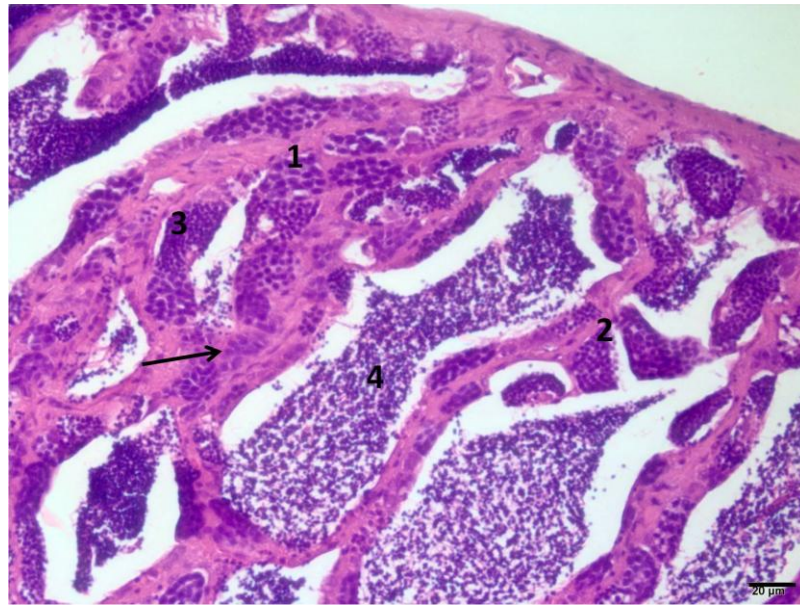


Figura 1: Fotomicrografia de corte histológico transversal de testículo de *Menticirrhus americanus* no período reprodutivo. Identificação de cinco estádios espermatogênicos, espermatogônias (seta), espermatócitos primários (1), espermatócitos secundários (2), espermátides (3) e espermatozóides (4). Barra 20  $\mu$ m. Coloração H-E.

Nenhuma das amostras de sêmen foi ativada em solução de 100 mOsm.kg<sup>-1</sup>. No entanto, duas entre as onze amostras de sêmen foram ativadas em solução 200 mOsm.kg<sup>-1</sup> e com baixa motilidade, com escore avaliado em 1 (< 25%). Todas as amostras de sêmen foram ativadas em soluções a partir de 300 mOsm.kg<sup>-1</sup> sem apresentarem diferenças na motilidade (tempo e escore) até 900 mOsm.kg<sup>-1</sup>, com variação no tempo de 52 a 228 s (Fig.2) e escore de 1-5.

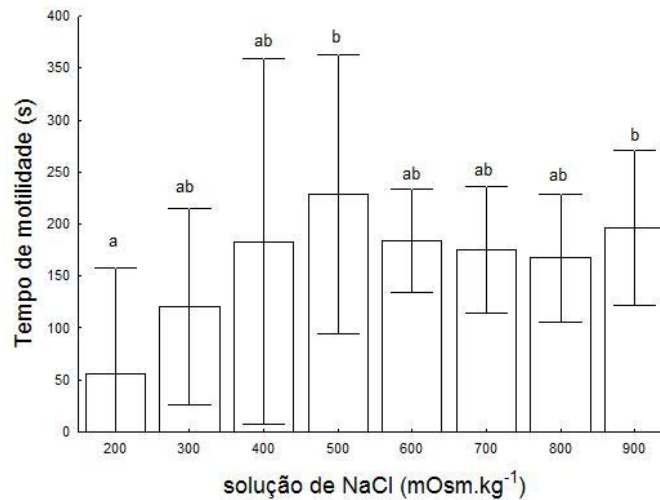


Figura 2: Tempo de motilidade do sêmen de *Menticirrhus americanus* ativado com diferentes osmolalidades (ANOVA; Tukey, P < 0,05, n = 11).

## RESFRIAMENTO

As amostras do sêmen provenientes dos testículos resfriados preservaram a motilidade até 6h, mas com perda de motilidade (escore) em 6h comparando aos tempos zero e 3h (P<0,05). No entanto o sêmen extrusado se preservou, sem perda de motilidade (tempo e escore) até 15h.

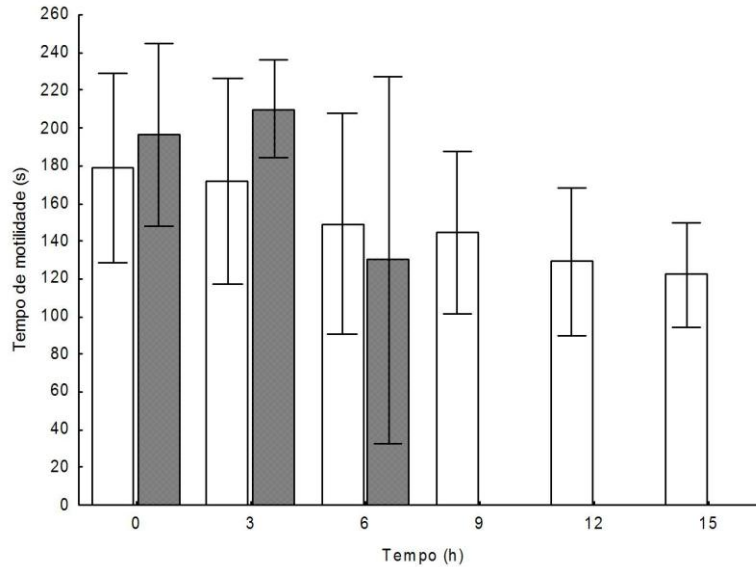


Figura 3: Tempo de motilidade dos espermatozóides de *Menticirrhus americanus* ativados a cada três horas. Com sêmên armazenado no testículo (barras cinzas) e sêmên extrusado (barras brancas) livre do testículo. Não foi verificada diferença ao longo do tempo no mesmo tratamento ( $P > 0,05$ ,  $n = 4$ ).

### CRIOPRESERVAÇÃO

Os espermatozóides após o descongelamento não apresentaram perda de qualidade no tempo de motilidade nas diferentes concentrações de DMSO. Mas houve redução no escore em DMSO 5% em relação ao sêmên fresco (Tab.1). Os resultados de integridade de membrana não apresentaram diferenças significativas nas diferentes concentrações de DMSO. A correlação entre os espermatozóides vivos e a motilidade dos espermatozóides não foi significativa ( $r^2 = 0,0013$ ;  $P = 0,7936$ ).

Tabela1: Tempo de motilidade, escore e integridade de membrana (células vivas) (média ± DP) do sêmen de *Menticirrhus americanus* fresco e criopreservado, em diferentes concentrações de DMSO.

	Tempo de motilidade*	Escore**	Integridade de membrana (%)*
Sêmen fresco	139 ± 37 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	-
DMSO 5%	129 ± 60 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.8 <sup>a</sup>	69 ± 10 <sup>a</sup>
DMSO 10%	155 ± 56 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.8 <sup>ab</sup>	71 ± 8 <sup>a</sup>
DMSO20%	140 ± 47 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.9 <sup>ab</sup>	69 ± 10 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na coluna representam diferenças significativas (P < 0,05; n = 11).

\*(ANOVA;Tuckey, α=5%; n=11), \*\*(Kruskall-Wallis; α=5%; n=11).

## DISCUSSÃO

A histologia das gônadas de *M. americanus* demonstrou que a espermiogênese estava ativa, comprovada pelos diferentes estádios dos gametas encontrados, incluindo gametas maduros (espermatozóides). O IGS médio registrado no presente estudo está de acordo com o valor encontrado em literatura para *M. americanus* no mesmo período (Muniz e Chaves, 2008).

A pressão osmótica é o fator mais importante por iniciar a motilidade e para a maioria das espécies marinhas os espermatozóides se tornam ativos em meio hiperosmótico (Cosson et al., 2008, Cabrita et al., 2009). Porém em *M. americanus* a ativação ocorreu em meio hiposmótico (300 mOsm.kg<sup>-1</sup>). A ativação em meio hiposmótico também foi descrita para *Sciaenops ocellatus* e *Cynoscion nebulosus* (Wayman et al., 1998, Wayman et al., 1996). A ativação em meio hiposmótico foi considerada baixa (< 20%) para as duas espécies, pois em condições hiperosmótica, houve aumento na porcentagem de células móveis. Entretanto, padrão de aumento na motilidade em meio hiperosmótico não foi observado em *M.americanus*. A ativação nesse meio pode ser atribuída a característica eurialina dessas espécies.

As características do sêmen apresentadas são os primeiros dados referentes para *M. americanus* no período reprodutivo. Esses dados são importantes, pois são próprios da espécie e podem ser utilizados futuramente como parâmetros comparativos na avaliação da qualidade espermática (Cabrita et al., 2009). Mas outras formas de avaliação da qualidade espermática ainda são sugeridas como a correlação do número de espermatozóides e espermátócrito (Sanchez et al., 2011, Tvedt et al., 2001). Essa correlação parece ser espécie-específica, já que além do presente trabalho, outras espécies também não apresentaram correlação entre esses parâmetros (Sanchez et al., 2011, Suquet et al., 1992). O tempo de motilidade dos espermatozóides para *M. americanus* foi superior ao descrito para o Sciaenidae *Umbrina cirrosa* (26-40s), o maior tempo é uma vantagem, pois a breve e limitada duração de motilidade dos espermatozóides pode resultar em efeito negativo no sucesso do processo de fertilização (Mylonas et al., 2004).

No resfriamento do sêmen, o resultado do menor período (6h) em que os espermatozóides responderam a ativação pode estar relacionado a falta de oxigênio. De acordo com Bobe e Labbe (2010) a falta de oxigênio nos tecidos *post mortem* é a principal causa responsável pela falta de motilidade dos espermatozóides. Embora os tubos com os testículos também estivessem abertos para permitir o contato com o ar atmosférico, os espermatozóides provavelmente estavam em condições hipóxicas no tecido. Explicando dessa forma o maior período (15 h) de viabilidade do sêmen quando mantido fora das gônadas.

Um dos métodos mais efetivos para avaliação do sucesso da criopreservação é o teste de integridade de membrana (Cabrita et al., 2010). O resultado do teste em *M. americanus* (69 – 71 % de células vivas) pós descongelamento mostrou que a técnica empregando como o DMSO foi efetiva na sobrevivência das células. Essa resultado foi superior ao encontrado para o sêmen de *Paralichthys orbignyanus* (43%) utilizando DMSO 10% (Lanes et al., 2008).

A criopreservação é interessante considerando o baixo volume de sêmen produzido em *M. americanus*. No caso de espécies que produzem pouco volume de sêmen em alta densidade, a técnica de criopreservação possibilita a diluição aumentando o volume do sêmen e facilitando o manuseio, inclusive durante a dispersão do sêmen sobre os ovócitos na fertilização artificial. Outra vantagem é o armazenamento prévio evitando a falta ou pouca quantidade de sêmen durante o processo de fertilização (Rurangwa et al., 2004).

As concentrações de DMSO não apresentaram diferenças para a motilidade, nem para integridade de membrana pós descongelamento, mas considerando a menor concentração devido a toxicidade do DMSO (David, 1972), a concentração de DMSO 5% é ideal na criopreservação de papa-terra. Essa indicação de DMSO é inferior às apresentadas para os Sciaenidae *S. ocellatus* e *Pogonias cromis* (7,5-15% e 10%, respectivamente) (Wayman et al., 1997, Wayman et al., 1998).

Os resultados obtidos no presente estudo são as primeiras informações de caracterização, resfriamento e criopreservação de sêmen de *M. americanus*. Essas informações são importantes para estudos futuros, no empenho para criação e desenvolvimento de métodos efetivos para seleção de reprodutores com alto desempenho reprodutivo.

## REFERÊNCIAS

Bobe, J., Labbé, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. Gen. Comp. Endocr. 165, 535-548.

Borges, A., Siqueria, D.R., Jurinitz, D.F., Zanini, R., Amaral, F., Grillo, M.L., Oberst, E.R.,

Wassermann, G.F. 2005. Biochemical composition of plasma seminal and annual variation in sperm characteristics of *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). Fish. Physiol. Biochem. 31, 45-53.

- Cabrita ,E., Robles, V., Herráez, P. 2009. Sperm quality assessment. In: Methods in reproductive aquaculture. Marine and Freshwater species. (eds. Cabrita ,E., Robles, V., Herráez, P.) pp.93-148. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J.,Pérez-Cerezales, Herráez, M.P. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. J. Appl. Ichthyol. 26, 623-635.
- Chen, S., Ji, X., Yu G., Tian, T., Sha, Z. 2004. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. Aquaculture 236, 547-556.
- Cosson, J, Groison, A., Suquet, M., Fauvel, C. 2008. Motility characteristics of spermatozoa in cod (*Gadus morhua*) and hake (*Merluccius merluccius*). Cybium 32 (1), 176-177.
- David, N.A., 1972. The pharmacology of the dimethyl sulfoxide 6544. Annu. Rev. Pharmacolog. 12, 353-374.
- Lanes, C.F.C., Okamoto, M., Cavalcanti, P.V., Collares, T., Campos, V. F., Deschamps, J.C., Robaldo, R.B., Marins, L.F., Sampaio, L.A., 2008. Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys obignyanus*) sperm. Aquaculture 275, 361-365.
- Lanes, C.F.C., Okamoto, M.H., Bianchini, A., Marins, L.F., Sampaio, L.A., 2010. Sperm quality of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* throughout the reproductive season. Aquac. Res. 41, 199-207.
- Menezes, N., Figueiredo, J., 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV Teleostei (3). São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, pp. 96.



- Muniz, E., Chaves, P., 2008. Condição reprodutiva da betara preta, *Menticirrhus americanus* (Teleostei, Sciaenidae), na pesca realizada no litoral norte de Santa Catarina, Brasil. Acta Sci. Biol. Sci. 30(4), 339-344.
- Mylonas, C.C., Kyriakou, Y., Sigelaki, I., Georgiou, G., Stephanou, D., Divanach, P., 2004. Reproductive biology of shi drum (*Umbrina cirrosa*) in captivity and induction of spawning using GnRHa. Isr. J. Aquacult.-Bamid 56, 75-92.
- Protocolo ético de anestesia Rosalind Franklin University of Medicine and Science. Institutional Animal Care and use Committee. Acesso website: <http://rosalindfranklin.edu/dnn/research/animal/guideines/tabid/763/default.aspx>
- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollivier, F., Nash, J.P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture 234, 1-28.
- Sanches, E.A., Marcos, R.M., Baggio, D.M., Tessaro, L., Balen, R.E, Bombardelli, R.A. 2011 Sperm concentration estimate of fish semen using spermatocrit method. Rev. Bras.Zootecn. 40, 1163-1167.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., Billard, R. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. Aquac. Res. 31, 231-243.
- Suquet, M., Omnes, M.H., Normant, Y., Fauvel, C. 1992. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 101, 177-185.
- Tian, Y, Chen, S., Ji, X., Zhai, J., Sun, L., Chen, C., Su, P. 2008 Cryopreservation of spotted halibut (*Verasper variegatus*) sperm. Aquaculture 284, 268-271.
- Tiersch, T.R, Wayman, W.R., Skapura, D.P., Neidig, C.L., Grier, H.J. 2004. Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). Aquac. Res. 35, 278-288.

- Tvedt, H.B, Benfey, T.J., Martin-Robichaud, D.J., Power, J. 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* 194, 191-200.
- Wayman, W R, and T R Tiersch. 1998. Refrigerated storage and cryopreservation of sperm of red drum , *Sciaenops ocellatus* L . *Aquaculture*, 29: 267-273.
- Wayman, W.R., Thomas, R.G., Tiersch, T.R, 1996. Cryopreservation of sperm of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Gulf Res. Rep.* 9, 183-188.
- Wayman, W.R., Thomas, R.G., Tiersch, T.R. 1997. Refrigerated storage and cryopreservation of black drum (*Pogonias cromis*) spermatozoa. *Theriogenology*, 47: 1519-1529.

## DISCUSSÃO GERAL

No presente estudo o uso de hCG foi eficiente para a maturação final e na produção de ovos e larvas nas diferentes dosagens (300, 600 e 900 UI.kg<sup>-1</sup>) utilizadas. Mas os melhores resultados para desempenho reprodutivo e produção de larvas foram verificados na dosagem intermediária (600 UI hCG.kg<sup>-1</sup>).

Quando comparamos a dosagem de hCG indicada no presente estudo com a de outro Sciaenidae verificamos uma indicação menor para *Micropogonias furnieri* (300 UI.kg<sup>-1</sup>), mas dosagem semelhante indicada para *Scieanops ocellatus* (600 UI.kg<sup>-1</sup>) (Lee, 1997, García-Alonso e Vizziano, 2004).

O hCG (300 UI kg<sup>-1</sup>) atuou ainda no recrutamento de ovócitos vitelogênicos ( $\geq 385 \mu\text{m}$ ) para a maturação final e na redução de ovócitos atrésicos. Essa diminuição de ovócitos atrésicos foi atribuída ao efeito deletério do hCG na desregulação endócrina reprodutiva. E assim como relatado para peixes teleósteos, em geral, os ovócitos atrésicos em *M. americanus* foram observados apenas em ovócitos em vitelogênese (Miranda, et al., 1999).

O período de latência variou conforme a dosagem utilizada e a importância desses diferentes períodos consistem em evitar o “overripening”, uma das principais perdas de qualidade nos ovos (Bromage et al., 1994).

No desenvolvimento dos ovócitos foi possível verificar o crescimento dos ovócitos, com aumento significativo do diâmetro até a maturação final. No processo vitelogênico, o aumento de tamanho está relacionado à deposição de lipídios e de vitelogenina nos ovócitos (Le Menn et al., 2007). Na fase final da maturação o crescimento é atribuído à coalescência das vesículas de lipídios e dos grânulos de vitelo, resultado em aumento de osmólitos nos ovócitos e consequentemente hidratação por osmose nos ovócitos (Skoblina, 2010)

Baseado na descrição de desenvolvimento ovocitário de *M. americanus* a maturação ovócitos é do tipo grupo sincrônica com mais de dois lotes de ovócitos em desenvolvimento, sugerindo desovas parceladas durante o período reprodutivo (Vazzoler, 1996).

Os resultados dos trabalhos envolvendo os machos de *M. americanus* possibilitaram a caracterização do testículo e do sêmen e essas características podem ser utilizadas como uma ferramenta para estabelecer parâmetros de análise da capacidade reprodutiva (Lanes et al., 2010). Embora para *M. americanus* a osmolalidade de ativação ocorra em solução hiposmótica (300 mOsm.kg<sup>-1</sup>) outras espécie (*Sciaenops ocellatus* e *Cynoscion nebulosus*) apresentaram o mesmo condição, atribuída a característica eurialina dessas espécies (Wayman et al., 1998, Wayman et al., 1996).

O modo indicado de armazenamento refrigerado do sêmen é extrusado, pois mantém o espermatozóide preservado por mais tempo (15h) do que mantido resfriado no testículo (6h). O pior desempenho pode estar ligado a situação de hipóxia dos espermatozoides no testículo que é a principal causa de morte de espermatozóide (Bobe e Labbe, 2010). Uma das características do sêmen de *M. americanus* é o pouco volume produzido e alta viscosidade. Essas características dificultam a manipulação devido a pouca quantidade e dificuldade de homogeneização para a fertilização a seco. Entretanto, a técnica de criopreservação permite a estocagem de forma diluída facilitando sua utilização. Piironen (1995) estabelece que uma das condições do armazenamento é que a técnica preserve a capacidade de motilidade, o que pode ser verificado no semen de *M. americanus* criopreservados em DMSO. A concentração de DMSO indicada foi inferior às concentrações sugeridas (7,5-15% e 10%, respectivamente) para os Sciaenidae *S. ocellatus* e *Pogonias cromis* (Wayman et al., 1997, Wayman et al., 1998).

A presente tese resultou em reprodução induzida e permitiu o uso de técnicas para viabilizar a reprodução de *M. americanus* em cativeiro. Embora o objetivo da tese tenha sido alcançado mais informações da biologia da espécie são necessárias tanto de machos quanto de fêmeas, ovos, larvas e juvenis, para a produção da espécie em cativeiro e para que a espécie possa ser explorada na aquicultura marinha ou estuarina.

## REFERÊNCIAS

- Bobbe, J., Labbé, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocr.* 165, 535-548.
- Bromage, N., Bruce, M., Basavaraja, N., Rana, K., Shields, R., Young, C., Dye, J., Smith, P., Gillespie, M., Gamble, J., 1994. Egg quality determinants in finfish the role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *J. World Aquacult. Soc.* 25, 13-21.
- David, N.A., 1972. The pharmacology of the dimethyl sulfoxide 6544. *Annu. Rev. Pharmacolog.* 12, 353-374.
- García-Alonso, J., Vizziano, D., 2004. Induction of oocyte maturation in the white croaker *Micropogonias furnieri* (Pisces: Sciaenidae) by human chorionic gonadotropin. *Braz. J. Biol.* 64, 73-80.
- Lanes, C.F.C., Okamoto, M.H., Bianchini, A., Marins, L.F., Sampaio, L.A., 2010. Sperm quality of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* throughout the reproductive season. *Aquac. Res.* 41, 199-207.
- Le Menn, F., Cerdà, J., Babin, P.J., 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: Babin, P.J., Cerdà, J., Lubzens, E.

- (Eds.) The fish oocytes: from basic studies to biotechnological applications. Springer - Netherlands. 1-38p.
- Lee, C.S., 1997. Marine finfish hatchery technology in the USA – status and future. *Hydrobiologia* 358, 45-54.
- Miranda, A.C.L., Bazzoli, N., Rizzo, E., Sato, Y., 1999. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. *Tissue Cell* 31, 480-488.
- Piironen, J., 1995. Composition and cryopreservation of sperm from some Finfish fresh teleost fish. *Finn. Fish. Res.* 15, 65-86.
- Skoblina, M.N. 2010. Hydration of oocytes in teleost fishes. *Russ. J. Dev. Biol.* 41, 1-12.
- Vazzoler, A.E.M., 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática. UDEM. Maringá. pp. 169.
- Wayman, W R, and T R Tiersch. 1998. Refrigerated storage and cryopreservation of sperm of red drum , *Sciaenops ocellatus* L . *Aquaculture*, 29: 267-273.
- Wayman, W.R., Thomas, R.G., Tiersch, T.R, 1996. Cryopreservation of sperm of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Gulf Res. Rep.* 9, 183-188.
- Wayman, W.R., Thomas, R.G., Tiersch, T.R. 1997. Refrigerated storage and cryopreservation of black drum (*Pogonias cromis*) spermatozoa. *Theriogenology*, 47: 1519-1529.