CARLOS EDUARDO DE OLIVEIRA GARCIA

Versão corrigida conforme a Resolução CoPGr: 5890

Original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da Universidade
de São Paulo

**Perfil dos esteroides gonadais e expressão dos hormônios folículo
estimulante (FSH) e luteinizante (LH) durante a inversão sexual de
Epinephelus marginatus (Teleostei: Serranidae), hermafrodita
protogínico, utilizando-se inibidor de aromatase.**

**Gonadal steroids profile and expression of follicle-stimulating (FSH) and
luteinizing (LH) hormones during the sex reversal of *Epinephelus
marginatus* (Teleostei: Serranidae) hermaphroditic protogynous, using
aromatase inhibitor.**

SÃO PAULO

2012

CARLOS EDUARDO DE OLIVEIRA GARCIA

Perfil dos esteroides gonadais e expressão dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) durante a inversão sexual de *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), hermafrodita protogínico, utilizando-se inibidor de aromatase.

Gonadal steroids profile and expression of follicle-stimulating (FSH) and luteinizing (LH) hormones during the sex reversal of *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae) hermaphroditic protogynous, using aromatase inhibitor.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências, área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra Renata Guimarães Moreira

SÃO PAULO

2012

Ficha catalográfica

Garcia, Carlos Eduardo de Oliveira

Perfil dos esteroides gonadais e expressão dos hormônios foliculo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) durante a inversão sexual de *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), hermafrodita protogínico, utilizando-se inibidor de aromatase / Carlos Eduardo de Oliveira Garcia ;
Orientadora: Renata Guimarães Moreira. -- São Paulo, 2012.
92 f.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia

1. *Epinephelus marginatus*. 2. Inversão Sexual. 3. Inibidor de Aromatase. 4. Esteroides Sexuais. 5. Gonadotropinas. 6. Densidade Espermática.

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título

Comissão Julgadora

Dra. Fabiana L. Lo Nostro
Universidad de Buenos Aires

Dra. Maria Inês Borella
Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

Dr. Sergio Ricardo Batlouni
Universidade Estadual Paulista “Julio
de Mesquita Filho”-campus: Jaboticabal

Dr. Fernando Ribeiro Gomes
Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Dra. Renata Guimarães Moreira
Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

À Andréia,

companheira e amiga; pelo amor, dedicação e estímulos ...

Ao meu filho Matheus,

por ter proporcionado a oportunidade e a alegria de conhecer um
sentimento novo; inexplicável: amor incondicional; amor de pai,

DEDICO.

EPÍGRAFES

Millôr Fernandes: *“Certas coisas só são amargas se a gente as engole”*

Millôr Fernandes: *“Há duas coisas que ninguém perdoa: nossas vitórias e nossos fracassos”*

Mário Quintana: *“A resposta certa, não importa nada: o essencial é que as perguntas estejam certas”*

Rubem Alves: *“Mas na profissão, além de amar tem de saber. E o saber leva tempo pra crescer”*

Cora Coralina: *“Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”*

Vinícius de Moraes: *“Quem já passou por essa vida e não viveu, pode ser mais, mas sabe menos do que eu...”*

Vinícius de Moraes: *“A vida é a arte do encontro, embora haja tanto desencontro pela vida”*

Gonzaguinha: *“E é tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho por mais que pense estar”*

Gonzaguinha: *“Viver e não ter a vergonha de ser feliz, Cantar e cantar e cantar: A beleza de ser um eterno aprendiz”*

Leonardo Boff: *“Todo ponto de vista é a vista de um ponto”*

Millôr Fernandes: *“Fique tranquilo: sempre se pode provar o contrário”.*

AGRADECIMENTOS

Ao Criador e criaturas, por oferecerem a força propulsora da evolução humana: o enigma da vida.

A minha família em Jaboticabal e de São Paulo que estão sempre presentes, apoiando e incentivando; mostrando-se presente em tudo o que faço.

À Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira pela amizade, oportunidade, orientação, incentivo, apoio e dedicação constantes, compartilhando erros e acertos. Cabe aqui um agradecimento especial à amiga “Reca”, a “Renatinha” que faz parte de minha jornada desde a época da Universidade e que soube ser orientadora e amiga ao mesmo tempo.

Lembro-me da primeira viagem a Ubatuba, quando fizemos o contato com o Eduardo Sanches, no Instituto de Pesca... primeiro passo para iniciarmos o trabalho com garoupa. Reca, obrigado por ter acreditado nessa história desde o início. Hoje ao ver a estrutura montada em Barequeçaba e a formação de uma equipe de trabalho; só tenho elogios para a forma e modo profissional que você conduziu e implantou essa nova linha de pesquisa em seu laboratório. Fiquei e fico muito contente em participar dessa história.

Gostaria de agradecer também ao Eduardo Sanches do Instituto de Pesca, pelo apoio e troca de ideias, principalmente no início dessa jornada em Ubatuba.

...fase inicial de trabalhos, muitas viagens a Ubatuba, parceiro novo de trabalho Jajá-Jandyr que ajudou a estabelecer os protocolos de inversão, a parte de corte e montagem de lâminas histológicas das gônadas.... Valeu!

Na fase de trabalhos em Ubatuba um agradecimento especial ao amigo-irmão Greguinho; longas conversas ao pé da churrasqueira, sempre com palavras de incentivo e colocando sua casa fantástica a disposição “pro que der e vier”.

Também gostaria de agradecer a Claudia e ao Pedro por terem ajudado a montar o primeiro experimento em seu empreendimento na Ilha Bela, a acolhida em sua residência e a troca de experiência nos trabalhos com a garoupa. Muito obrigado.

Na fase de escrita do projeto do (CNPq) dois novos parceiros do laboratório; Bruno e Paulo, na verdade olhando as fotos vocês estavam presentes na primeira coleta em Ubatuba juntamente com o Honji.

Bom, gostaria de agradecer também aos demais participantes desse novo projeto “Reprodução e larvicultura da garoupa verdadeira, *Epinephelus marginatus* na região Sudeste do Brasil” pela oportunidade de aprendizado. Obrigado: Profa.Dra. Renata Moreira, Prof. Dr. Daniel Eduardo Lavanholi de Lemos, Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf, Bruno Cavalheiro Araújo, Jandyr de Almeida Rodrigues-Filho, Paulo Henrique de Mello.

Fase de implantação das estruturas no CEBIMar...muito trabalho e esforço....Bruno, Jajá e Paulo, gostaria de deixar registrado e parabenizá-los pela empreitada.

Ao Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar/USP) que nos acolheu como parceiros e colocou toda a sua infraestrutura à disposição para realizarmos os trabalhos. Especialmente aos funcionários da diretoria, área técnica, motoristas, equipe de manutenção e pesquisadores que, no dia a dia de trabalho, nos receberam tão bem e se mostraram sempre dispostos a ajudar.

Aos pescadores do Pouso da Cajaíba, local e pessoas especiais... Marinho valeu pelo esforço na captura das garoupas e na ajuda com o contato com os pescadores.

Aos pescadores da Ilha do Montão de Trigo, a todos que estão nos ajudando na captura dos animais.

A Amandinha, um agradecimento especial por me apresentar esse novo caminho de estudos; a biologia molecular com todos as suas peculiaridades. Grande parceira seja em coleta ou no laboratório.

Ao Danilo (CESP) pela ajuda com o método de densidade espermática e pela disposição e entusiasmo nas conversas sobre piscicultura.

Ao amigo-irmão Valente que sempre se mostrou entusiasmado com esse trabalho, seja na troca de ideias ou mesmo com o empréstimo de sua caminhonete na busca de animais em plena véspera de Natal. Valeu! Aqui também é preciso agradecer ao sobrinho Leandro que estava presente (desde o começo em Ubatuba) com sua máquina fotográfica e filmadora registrando parte dos trabalhos.

Ao Honji, pela ajuda na coleta das hipófises no experimento 3 e conversas informais nos trabalhos com a histologia... na operação do Word na colocação do número de páginas na hora do aperto.Valeu!

À Profa. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter pelo espaço cedido em seu laboratório, pelo apoio material, pela disponibilidade e sugestões para a execução dos experimentos de biologia molecular. Gostaria também de deixar registrado o acolhimento do pessoal do laboratório (Fernanda, Sandra, Carol, Carmen), sempre dispostos a ajudar.

Ao Ricardo, um agradecimento especial por ter ajudado a finalizar as reações de biologia molecular, por ter dado apoio e se colocado como verdadeiro parceiro na realização dessa etapa do trabalho.

A todos os integrantes atuais e que passaram pelo LAMEROA: Aline Gomes, Amanda Narcizo, Andreone Medrado, Bianca Kida, Bruno Cavalheiro, Carlos Eduardo Tolussi (Kadu), Carolina Pozzebom, Cristiële Ribeiro, Débora Silva, Gabriela Brambila, Jandyr Rodrigues Filho, Juliane Suzuki, Larissa Suzuki, Paulo Mello, Raisa Pereira, Renato Honji, Tiago Gabriel e Vanessa Vieira, Walquiria Parreira.

À chefia do Departamento de Fisiologia do IBUSP, Profa. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter e ao coordenador do Programa de Pós-Graduação, Prof. Dr. José Guilherme Chauí-Berlinck pelo apoio concedido.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia do IBUSP, pela colaboração, em especial ao técnico Vagner Alberto e às meninas das secretarias.

A banca de qualificação, Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes, Prof. Dr. Hamilton Haddad Junior e a Profa. Dra. Maria Aparecida Visconti; que contribuiu para meu aprimoramento profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida (Processo: 154673/2010-2).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro do projeto (Processo: 2007/59122-7).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)-apoio financeiro do projeto (CNPq -Edital nº 36/2009).

A todos os amigos que sempre estiveram ao meu lado, agradeço pela inesgotável fonte de força.

ÍNDICE

RESUMO	III
ABSTRACT	V
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Procedimento Experimental	14
3.1 1. Primeiro Experimento	14
3.1 2. Segundo Experimento	16
3.1 3. Terceiro Experimento	17
3.2. Análise histológica das gônadas	18
3.3. Análise do sêmen	18
3.4. Perfil plasmático dos esteroides gonadais	19
3.5. Desenho experimental das análises moleculares: Estudo da expressão gênica de FSH, LH e fator de alongação EF1 α como gene normalizador	20
3.5.1. Padronização experimental	20
3.5.2. Experimentos de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	23
3.6. Proteínas Totais	25
3.7. Análise Estatística	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Primeiro Experimento	26

4.1.1. Análises histológicas das gônadas	26
4.1.2. Análise do sêmen	27
4.1.3 Perfil dos esteroides gonadais	28
4.1.4 Proteínas totais	29
4.2. Segundo Experimento	30
4.2.1. Análises histológicas das gônadas	30
4.2.2. Perfil dos esteroides gonadais	31
4.2.3. Padronização experimental	32
4.2.4. Experimentos de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	33
4.2.5. Proteínas totais	34
4.3. Terceiro Experimento	35
4.3.1. Análises histológicas das gônadas	35
4.3.2. Análise do sêmen	36
4.3.3. Perfil dos esteroides gonadais	36
4.3.4. Experimentos de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	37
4.3.5 Proteínas totais	38
5. DISCUSSÃO	39
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8. TABELAS	67
9. FIGURAS	70

Resumo

A plasticidade do desenvolvimento gonadal em peixes, que contrasta com os padrões mais estáveis encontrados nos demais vertebrados, deu origem a várias questões intrigantes relativas tanto ao seu significado adaptativo quanto aos fatores genéticos e fisiológicos que modulam o processo. A inversão do sexo em peixes hermafroditas sequenciais (protândricos ou protogínicos) ocorre em decorrência de diversos fatores, dentre eles, fisiológicos, genéticos e comportamentais podendo ser ainda decorrente do comportamento social. A garoupa verdadeira, *Epinephelus marginatus* é um peixe teleósteo, hermafrodita protogínico característico do litoral rochoso, maturando primeiramente como fêmeas, e posteriormente, na vida adulta, os ovários são substituídos por testículos, transformando-os em machos reprodutivamente ativos. No presente trabalho foram realizados três experimentos de inversão sexual em condições assistidas, em diferentes estações do ano, utilizando a mesma dose do inibidor de aromatase (IA) letrozole (100µg/Kg) para promover a inversão sexual de *E. marginatus* visando contribuir e aprimorar o conhecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos nesse processo. O primeiro e o terceiro experimentos foram iniciados na metade e início da primavera respectivamente, e promoveram a inversão sexual em 100% dos animais do grupo experimental com uma diminuição no índice gonadossomático (IGS) nos animais do grupo experimental que apresentaram uma desorganização gonadal peculiar, com lamelas características de ovário, no entanto em seu interior observou-se o compartimento intersticial desenvolvido com cistos de células germinativas masculinas em estágios avançados da espermatogênese, (espermátócitos, espermátides) células de Sertoli e grande quantidade de cistos rompidos com a liberação de espermatozoides no lúmen. Após trinta dias do início destes experimentos obteve-se um aumento significativo de 11 ceto-testosterona (11KT) e a concentração de estradiol (E₂) permaneceu inalterada; no final destes experimentos constatou-se uma elevação na concentração de testosterona (T), uma queda nos níveis de 11KT, persistindo a manutenção na concentração de E₂. Nesse momento o número de cópias obtidas de

β FSH na hipófise foi significativamente menor que o número encontrado nos animais do grupo controle do terceiro experimento. Os machos invertidos produziram um volume médio de sêmen de $118,20 \pm 24,83 \mu\text{L}$ com motilidade de 90%, densidade espermática de $8,94 \pm 4,34 \times 10^9$ células mL^{-1} . Não foram obtidas diferenças nas concentrações de proteínas totais plasmática, hepática e musculares. No experimento implantado no verão de 2010 o tratamento não promoveu a inversão sexual, o IGS não apresentou diferença significativa entre os animais tratados com inibidor de aromatase e os animais do grupo controle. Nas gônadas dos animais do grupo experimental foi observada uma ligeira desorganização da arquitetura gonadal com cistos em formação e um número grande de ovócitos em degeneração demonstrando que ao longo do processo de inversão sexual pode haver uma fase de intersexo. Após trinta dias do início do experimento obteve-se um aumento significativo de T e a concentração de E_2 permaneceu inalterada. Não foram observadas diferenças significativas entre o número de cópias de β FSH e β LH ao longo do experimento. O resultado obtido para a concentração de proteínas totais do músculo dos animais do grupo experimental apresentou um aumento significativo em relação à concentração encontrada nos animais do grupo controle. Não ocorreu espermição e a inversão se deu de forma incompleta promovendo indivíduos intersexo. De uma forma geral podemos concluir que o uso de inibidor de aromatase é um método eficaz para promover a inversão sexual em hermafroditas protogínicos como a garoupa verdadeira. O aumento dos andrógenos pode ser o gatilho da inversão sexual com papel fundamental na reestruturação gonadal e formação do tecido germinativo masculino neste processo.

Abstract

The plasticity of gonadal development in fish, which contrasts with the more stable patterns found in other vertebrates, has given rise to several thrilling questions concerning both, its adaptive significance regarding the genetic and physiological factors that modulate the process. The sex inversion in sequential hermaphrodites fish (protandrous or protogynous) occurs due to several factors, including, physiological, genetic and behavioral, and may also be due to social behavior. The dusky grouper, *Epinephelus marginatus* is a teleost fish, protogynous hermaphrodite characteristic of rocky bottoms, maturing first as females and later in adult life, the ovaries are replaced by the testes, turning them into reproductively males. In this work three sex inversion experiments were performed in captivity in different seasons of the year, using the same dose of aromatase inhibitor (AI) letrozole (100µg/Kg) to promote sexual inversion in *E. marginatus*, to contribute and improve the knowledge of the physiological mechanisms involved in this process. The first and third experiments started in the middle and early spring, respectively and promoted 100% sexual inversion in experimental group with a decrease in the gonadosomatic index (GSI) in the animals from the experimental group, that showed a peculiar disorganized gonadal, with lamellae, characteristic from ovaries, however with an interstitial compartment developed with cysts of male germ cells in advanced stages of spermatogenesis (spermatocytes, spermatids), Sertoli cells and a large amount of cysts ruptured with the release of sperm in the lumen. After thirty days from the beginning of these experiments, there was an increase in 11-ketotestosterone (11KT) levels and an unchanged concentration of estradiol (E₂); in the end of it, there was a significant increase in testosterone (T) levels, a decrease in the 11KT levels and the maintenance of E₂ plasma concentration. At this moment the number of copies of pituitary βFSH produced was significantly lower than the number of copies in the control animals of the third experiment. Inverted males produced an average volume of semen of 118.20 ± 24.83 µl with 90% motility

and sperm density of $8.94 \pm 4.34 \times 10^9$ cells.ml⁻¹. No differences were obtained at the concentrations of total protein in plasma, liver and muscle. In the experiment established in the summer of 2010, the treatment did not promote sexual inversion, the GSI was not significantly different between animals treated with aromatase inhibitor and the control group. In the gonads of the animals from the experimental group there was a slight disruption of gonadal architecture with cysts in formation and a large number of degenerating oocytes showing that during the process of sex inversion may be a phase of intersex. Thirty days after the beginning of the experiment there was a significant increase of T and E₂ concentration remained unchanged. No significant differences were observed between the number of copies of β FSH and β LH throughout this experiment. The result obtained for the total protein concentration of the muscle in experimental group showed a significant increase compared with the control animals. There was no spermiation and the sex inversion occurred incompletely, with the presence of intersex individuals. In general we could conclude that the use of an aromatase inhibitor is an effective method to promote the sex inversion in hermaphroditic protogynous as the groupers. The increase of androgens could trigger the sex inversion exerting an important role in gonadal restructuring and the development of male germ tissue in the process.

1. INTRODUÇÃO

Com o curso do desenvolvimento e uso de novas tecnologias no século XXI a espécie humana apresenta perspectivas de crescimento tanto na longevidade como no número de pessoas, aumentando ainda mais a pressão sobre a exploração dos recursos naturais e a necessidade de se desenvolver tecnologias para garantir a produção de alimentos de forma sustentável.

Considerando-se a área hídrica do planeta e os investimentos na produção de alimentos de forma sustentada, a produção de peixes como proteína de alta qualidade é destacada. O potencial da piscicultura marinha no Brasil é enorme tendo em vista as condições climáticas, hidrográficas e da biodiversidade ao longo de todo o litoral. Sendo assim, os investimentos devem ser realizados no sentido de gerar conhecimentos sobre as espécies nativas considerando-se estudos sobre fisiologia, biologia reprodutiva e ecologia da ictiofauna, estabelecendo-se assim as condições desejadas para a produção sustentável e preservação do meio ambiente.

A manutenção da saúde e biodiversidade de um ecossistema depende de certa forma da capacidade de manutenção dos processos reprodutivos e das condições internas dos organismos que sofrem influência ou são diretamente controlados por ações hormonais. Desta forma, para que seja obtido sucesso nos estudos da reprodução de uma espécie é necessário conhecer a fisiologia da reprodução, assim como as táticas e estratégias que a espécie adota ao longo do seu ciclo reprodutivo (Baldisserotto e Gomes, 2005).

De maneira geral, a reprodução dos peixes (e nos demais vertebrados) é regulada pelo eixo hipotálamo – hipófise – gônadas. Os fatores ambientais como a temperatura, pluviosidade, fotoperíodo entre outros modulam o processo reprodutivo dos teleósteos. Os sinais ambientais são transduzidos em sinais eletroquímicos que estimulam neurônios sensoriais que por sua vez estimulam o hipotálamo. O hipotálamo pode modular a liberação das gonadotropinas sintetizadas na hipófise pela liberação de vários neuro-hormônios como a dopamina, ácido gama-aminobutírico (GABA), o neuropeptídeo Y, a serotonina entre outros; mas o agente hipotalâmico

principal é o neuropeptídeo conhecido como GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas). Neurônios hipotalâmicos sintetizam e liberam o neuro-hormônio GnRH que estimula a hipófise a liberar as gonadotropinas, LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo-estimulante), que por sua vez irão estimular a produção dos esteroides gonadais (Guiguen et al., 2010). Os teleósteos não apresentam o sistema porta-hipofisário (sistema de vasos sanguíneos que estabelecem conexão entre o hipotálamo e a hipófise), a liberação de neuro-hormônios ocorre de forma direta por inervação que se estende até a hipófise (Zohar et al., 2010).

A concentração plasmática dos esteroides gonadais está relacionada com a diferenciação sexual e estágio de maturação dos gametas. Sabe-se que a manutenção da concentração plasmática de estradiol está relacionada com a determinação e manutenção do sexo feminino e a sua diminuição pode interromper o processo de vitelogênese e maturação do ovócito, assim como permitir o desenvolvimento do sexo masculino (Fostier et al., 1983).

Hayes (1998) já destacava a diferença entre os mecanismos diretamente envolvidos na determinação do sexo e a diferenciação sexual relacionada ao desenvolvimento dos testículos ou ovários.

Entre os vertebrados há uma grande diversidade de mecanismos relacionados à determinação e manutenção do sexo que abrangem fatores genéticos (GSD - *Genetic sex determination*) e fatores ambientais (ESD- *Environmental sex determination*). O grupo dos peixes teleósteos é o único no qual todos esses mecanismos de determinação e manutenção do sexo são evidenciados apresentando a maior diversidade em relação ao fenótipo sexual (Blasquez e Somoza, 2010; Norris, 2011).

Os padrões de sexualidade dos peixes teleósteos são determinados por diferentes fatores, sejam eles internos ou externos (Price, 1984). Referindo-se somente às funções reprodutivas o padrão sexual é determinado pelas características reprodutivas de uma espécie, que pode ser classificada como gonocorística ou hermafrodita (Sadovy e Shapiro, 1987).

Na reprodução de espécies gonocorísticas são encontrados indivíduos que se comportam exclusivamente como machos e indivíduos que se comportam exclusivamente como fêmeas; já na reprodução de espécies

hermafroditas um indivíduo pode apresentar comportamento tanto de macho como de fêmea ao longo da vida (Mitcheson e Liu, 2008).

São reconhecidos dois modelos de hermafroditismo em peixes: hermafroditas simultâneos e sequenciais (Chan e Yeung, 1983; 1989; Price, 1984; Sadovy e Shapiro, 1987; Vazzoler, 1996, Reinboth, 1988; 1998; Devlin e Nagahama, 2002). O hermafroditismo simultâneo é pouco difundido e os indivíduos apresentam ambos os sexos funcionais ao mesmo tempo, caracterizado pela presença de tecido feminino e masculino desde os estágios iniciais de desenvolvimento gonadal. Já o hermafroditismo sequencial é amplamente difundido entre os teleósteos apresentando-se em duas formas distintas: a protandria e a protoginia. Na protandria, os indivíduos são inicialmente machos e mais tarde, na vida adulta, transformam-se em fêmeas, quando os testículos são substituídos por ovários funcionais (Reinboth, 1998). A protandria está presente em oito famílias de peixes teleósteos sendo que três destas famílias estão associadas a recifes de corais (Warner, 1988).

Mais frequente entre os teleósteos, na protoginia os indivíduos são inicialmente fêmeas e posteriormente, na vida adulta, os ovários são substituídos por testículos, transformando-os em machos reprodutivamente ativos (Devlin e Nagahama, 2002). Em pelo menos 14 famílias de peixes teleósteos encontram-se espécies hermafroditas protogínicas, das quais 11 estão associadas a recifes de corais (Warner, 1988).

A plasticidade do desenvolvimento gonadal em peixes que contrasta com os padrões mais estáveis encontrados em vertebrados deu origem a várias questões intrigantes relativas tanto ao seu significado adaptativo quanto aos fatores genéticos e fisiológicos que modulam o processo (Baroiller et al., 1999).

A inversão do sexo em hermafroditas sequenciais (protândricos ou protogínicos) ocorre em decorrência de diversos fatores, dentre eles, fisiológicos, genéticos e comportamentais, podendo ser ainda decorrente do comportamento social. A idade e a taxa de inversão sexual dos peixes hermafroditas são específicas em cada região geográfica (Devlin e Nagahama, 2002). O comportamento social e a ecologia das espécies que modulam o

processo de inversão sexual parecem atuar como iniciadores dos eventos em cascata que ocorrem no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas promovendo uma alteração na produção e liberação dos hormônios gonadais e uma reformulação completa do comportamento e estrutura das gônadas (Norris, 2011).

Os casos em que os fatores sociais atuam no controle da mudança de sexo parecem estar relacionados à tentativa de maximizar o potencial reprodutivo da espécie, influenciado pelo tamanho dos peixes, pela hierarquia social e a proporção sexual dentro de uma população (Mitcheson e Liu, 2008). Associados aos padrões sociais, uma mudança no padrão da esteroidogênese gonadal ocorre nestes animais e constitui em toda a base fisiológica que permite a inversão do sexo e as mudanças comportamentais relatadas (Frisch, 2004).

Há três classes de hormônios esteroides gonadais que atuam no processo de reprodução, os estrógenos (C₁₈), andrógenos (C₁₉) e progestágenos (C₂₁). Os esteroides podem exercer papéis diferentes em funções especializadas, embora muitos esteroides sejam quimicamente idênticos na maioria das classes de vertebrados. Os andrógenos e estrógenos são importantes em ambos os sexos, entretanto, os andrógenos predominam nos machos, enquanto os estrógenos predominam nas fêmeas. Em peixes, anfíbios e répteis, os andrógenos desencadeiam o desenvolvimento das características masculinas primárias no embrião e das características secundárias no juvenil. Os andrógenos também contribuem para o crescimento geral e a síntese proteica, em particular, a síntese de proteínas miofibrilares, evidenciado pela musculatura mais desenvolvida dos machos em relação às fêmeas em muitas espécies de vertebrados. Durante o ciclo reprodutivo, os andrógenos são sintetizados em maior quantidade e promovem a espermatogênese nos testículos. Já nas fêmeas os andrógenos servem de substrato para a síntese dos estrógenos (Randall et al., 2000).

Além de promoverem o desenvolvimento e maturação das células reprodutivas, os hormônios esteroides gonadais, estrógenos e andrógenos; também estão envolvidos no controle por *feedback* negativo na hipófise (modulação de FSH e LH) e no hipotálamo (modulação de GnRH) que

também sofrem o efeito da inibição de liberação de gonadotropinas sob a ação da dopamina (DA) (Evans e Claiborne, 2006).

A esteroidogênese é um processo complexo restrito às células específicas que estão envolvidas na conversão do colesterol em esteroides sexuais (Payne e Hales, 2004). A proteína regulatória da esteroidogênese (StAR) é encarregada do transporte do colesterol do citoplasma celular para o interior das mitocôndrias, onde a primeira enzima esteroidogênica específica (P450_{scc}) converte o colesterol a pregnenolona (Young et al., 2005).

Nos vertebrados em geral e em peixes, a aromatização dos andrógenos é o passo limitante na produção de estrógenos e é catalisada pela enzima esteroidogênica, aromatase. Nas fêmeas, nas camadas foliculares dos ovários, na fase de maturação gonadal, o FSH estimula a síntese de testosterona na camada teca que é difundida para a granulosa onde é aromatizada pela enzima aromatase e convertida em 17 β -estradiol (E2) (Nagahama, 1994; Lubzens et al., 2010).

Nas fêmeas de vertebrados os progestágenos possuem papel importante na maturação final e na ovulação. Em peixes, o LH estimula a camada teca do folículo a produzir o progestágeno 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP) que é transportado à camada granulosa e convertido a 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-one (17 α 20 β -DHP) pela enzima 20 β -hidroxiesteroide-desidrogenase (20 β HSD). O 17 α 20 β -DHP é o principal progestágeno responsável pela maturação final dos ovócitos e ovulação na maioria dos teleósteos (Figura 1) (Young et al., 2005; Lubzens et al., 2010).

A expressão do gene e a secreção de gonadotropinas (FSH e LH) são moduladas por uma série de fatores neuroendócrinos do hipotálamo, retroalimentação dos hormônios gonadais e fatores parácrinos. Tanto o FSH como o LH já foram isolados e caracterizados em um número razoável de teleósteos. As funções fisiológicas desses hormônios estão sendo muito estudadas principalmente nos salmonídeos, nos quais os dados encontrados nos trabalhos realizados demonstram que, de maneira geral, o FSH promove a vitelogênese e a espermatogênese (via ação de estrógenos e andrógenos, respectivamente) e o LH está envolvido com a maturação final, a ovulação e a espermição, via ação dos progestágenos (Levavi-Sivan et al., 2010). No

entanto, em tilápia, foi observado um aumento concomitante nos níveis de FSH e de LH durante a fase vitelogênica, sugerindo que, nessa espécie de perciforme o LH pode desempenhar um papel importante não só durante a maturação final dos ovócitos, mas também na vitelogênese (Aizen et al., 2007).

Análises imunohistoquímicas das células gonadotrópicas de *Epinephelus marginatus* foram conduzidas com sucesso utilizando-se anticorpos de salmão; a imunomarcacão mostrou a presença das células produtoras de FSH e LH na região da “*proximal pars distalis*” (PPD) e “*pars intermedia*” (PI). As células produtoras de LH e FSH apresentaram dualidade das células gonadotrópicas, ou seja, são distintas na hipófise de *E. marginatus*. Quando comparadas com as células de FSH, as células de LH foram predominantes, amplamente distribuídas e imunomarcadas mais intensamente (Rodrigues-Filho, 2010).

Nas gônadas masculinas (testículos) ocorre a espermatogênese, um processo altamente organizado e coordenado no qual as espermatogônias diploides se proliferam e se diferenciam para formar espermatozoides maduros (Nóbrega, 2006). Ao longo do controle endócrino e parácrino do processo de espermatogênese podemos observar três fases distintas:

- uma fase inicial de proliferação mitótica de células espermatogônias (células germinativas);
- a fase meiótica onde ocorre a recombinação das informações genéticas;
- a fase de espermiogênese, diferenciação e formação dos espermatozoides (Nóbrega et al., 2009).

Na grande maioria dos vertebrados os testículos são divididos internamente em dois compartimentos: o intersticial e o compartimento germinativo. No compartimento intersticial estão presentes as células de Leydig com função esteroideogênica, vasos de sangue, vasos linfáticos e macrófagos. Já o compartimento germinativo apresenta um epitélio com apenas dois tipos de células, as células de Sertoli (células somáticas) e as células germinativas, que são encontradas em diferentes estágios de desenvolvimento. As células germinativas só sobrevivem em estreita e contínua interação com as células de Sertoli, de modo que o número de

células de Sertoli pode determinar a capacidade espermatogênica de um testículo além de exercerem um papel preponderante (células alvo) nos sistemas de sinalização que regulam a espermatogênese. As células de Sertoli dão suporte para a sobrevivência das células germinativas garantindo o desenvolvimento e viabilidade dessas células (Nóbrega et al., 2009). Antes do início da espermatogênese, o estradiol (E_2) atua sobre as células de Sertoli, promovendo um efeito que pode estar relacionada com a renovação das células-tronco e espermatogônias (Figura 2) (Miura e Miura, 2003; Schulz et al., 2010).

Nos testículos dos peixes o processo de espermatogênese, assim como o de espermição é regulado pela secreção de FSH e LH hipofisários (Figura 3) e pela ação dos hormônios esteroides. Tanto o LH quanto o FSH produzidos na hipófise estimulam diretamente as células de Leydig promovendo a produção de hormônios esteroides nas gônadas (Schulz et al., 2010). O andrógeno 11ceto-testosterona (11KT) é o principal regulador da espermatogênese, enquanto o esteroide de indução de maturação (MIS) regula a espermição. Ambos os esteroides são sintetizados pelas células de Leydig dos testículos, após a estimulação exercida pelas gonadotropinas hipofisárias (Schulz e Miura, 2002).

O papel do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG) no processo de inversão sexual é inquestionável, mas há alguns pontos a serem esclarecidos quando se interroga como e quando os componentes do eixo atuam no processo; o hipotálamo é o centro iniciador? A evidente alteração dos teores dos esteroides atua como iniciador do processo ou é um mero resultado final da inversão? Os primeiros estudos investigando o papel exercido pelo eixo HPG no processo de inversão sexual baseavam-se em análises histológicas e em seguida, a atenção foi voltada para os mecanismos fisiológicos envolvidos (Norris, 2011). Kobayashi et al. (2010) utilizaram a metodologia da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para analisar a expressão gênica do β FSH e β LH ao longo do período de inversão sexual em teleósteo hermafrodita (*Epinephelus merra*) e relatou um aumento da expressão do β FSH após três semanas de experimento. Os níveis da expressão do β LH não variaram significativamente durante a mudança de sexo.

Em *Synbranchus marmoratus*, espécie protogínica dulcícola, um estudo do processo de inversão sexual em ambiente natural envolvendo 186 animais concluiu que o início da inversão sexual está associado a uma queda na concentração de estradiol plasmático, aumento na concentração de testosterona, e variações não significativas na concentração de 11KT (Antoneli, 2006).

A indução da inversão sexual em espécies protogínicas em condições assistidas vem sendo realizada com relativo sucesso utilizando a aplicação de andrógenos sintéticos, destacando-se trabalhos com espécies do gênero *Epinephelus*, conhecidos como *groupers*. Desde as décadas de 1980 e 1990, estudos utilizando andrógenos sintéticos vêm sendo realizados, sendo que a administração oral de 17 α -metiltestosterona (MT) por quatro meses promoveu a inversão sexual em *Epinephelus fario* (Kuo et al., 1988) e por sete meses em *Epinephelus tauvina* (Chao e Chow, 1990). Já o uso de implantes de MT em *E. tauvina* promoveu a inversão sexual, com a obtenção de machos funcionais após quatro meses do implante (Chao e Lim, 1991). Tan-Fermin et al. (1994) promoveu a inversão sexual da espécie protogínica *Epinephelus suillus* também com a administração de MT, mas constatou que após quatro meses da suspensão do tratamento, a inversão foi revertida.

Em experimento realizado no Brasil com a garoupa verdadeira *E. marginatus*, Sanches et al. (2009) adicionaram o andrógeno sintético MT no alimento e após seis meses de tratamento obtiveram sucesso na inversão sexual dos animais.

Sarter et al. (2006) utilizaram implantes de MT em exemplares juvenis de *E. marginatus* e obtiveram a inversão completa do sexo dos animais em 12 semanas. Após um ano do tratamento hormonal análises histológicas das gônadas comprovaram a persistência da inversão sexual.

Com o propósito de promover a inversão sexual precoce em indivíduos imaturos e fêmeas jovens de *E. marginatus* e obter esperma para crioconservação, Cabrita et al.,(2009) utilizaram implantes (2,5 mg/kg) de MT a cada 30 dias e após 60 dias todos os indivíduos recebiam uma única dose de Lucrin Depot®(20 μ g/kg BW, GnRHa) que era suficiente para induzir e ou aumentar a produção de esperma. Esse procedimento precisou ser

repetido ao longo de um período de três anos para obter machos funcionais, uma vez que a inversão sexual não era permanente.

Kitano et al., (2000) demonstraram que o tratamento de larvas de *Paralichthys olivaceus* geneticamente fêmeas com os chamados inibidores de aromatase (IA) (fadrozole) promovia a inversão sexual, queda nos níveis de estrógenos e suprimia a expressão gênica da enzima P450arom nas gônadas. A partir destes resultados, os IA começaram a ser utilizados em experimentos de inversão com diferentes espécies de teleósteos. Inibidores de aromatase também foram utilizados em experimentos com tilápias, *Oreochromis niloticus*, causando a inversão sexual completa em 30 dias (Afonso et al., 2001).

A utilização do IA (fadrozole) promoveu redução na concentração de estrógenos plasmáticos, acompanhado por uma degeneração de ovócitos no ovário e uma indução na síntese de testosterona com subsequente proliferação de células germinativas espermatogênicas, determinando a inversão sexual em fêmeas não maduras de *E. merra* em 90 dias quando o experimento foi realizado fora da estação reprodutiva (Bhandari et al., 2004a). Utilizando este mesmo inibidor na mesma espécie, porém em um período próximo da estação reprodutiva, a inversão ocorreu em 75 dias (Bhandari et al., 2004b). A mesma dose de IA (10mg/100g de peixe) promoveu a inversão sexual em *E. merra* em 90, em 75 e em 42 dias quando aplicada fora do período reprodutivo, em um período próximo do período reprodutivo e muito perto do período reprodutivo, respectivamente. A mesma dose foi aplicada ao longo do período reprodutivo nesta mesma espécie e não foi 100% eficiente, 40% dos animais permaneceram com o sexo feminino (Alam et al., 2006a).

Os serranídeos hermafroditas protogínicos, por apresentarem uma estação de desova bem definida com agregação na época reprodutiva, são mais vulneráveis a pesca quando comparados aos peixes dióicos (Coleman et al., 2001). Os machos de *E. marginatus* são de tamanhos maiores e a pesca comercial desta espécie vem capturando cada vez mais indivíduos de comprimentos menores, o que dificulta todo o processo de maturação até a inversão de sexo nesta espécie. A forte pressão de pesca aliada à falta de

manejo destas atividades, maturação sexual tardia, agregação na época reprodutiva e a ampla utilização na culinária mundial levaram à inclusão de *E. marginatus* na lista da IUCN (*The World Conservation Union*) como espécie sobrexplotada (Cornish e Harmelin-Vivien, 2004). No Brasil e no litoral de São Paulo, esta espécie foi incluída na lista de "Sobre-exploradas ou ameaçadas de sobre-exploração" (São Paulo, 2008; Rodrigues-Filho et al., 2009).

O conhecimento dos mecanismos fisiológicos, principalmente a compreensão do papel exercido pelos hormônios esteroides envolvidos na inversão do sexo de espécies hermafroditas protogínicas como a *E. marginatus* são muito valiosos para a formação precoce de machos viabilizando trabalhos tanto na de reprodução induzida (nosso grupo também vem desenvolvendo pesquisas com a espécie aqui em questão, estudando a "Reprodução e larvicultura da garoupa verdadeira, *Epinephelus marginatus* na região Sudeste do Brasil"; Edital MCT/CNPq/CT-Agronegócio/MPA no.036/2009) como na condução de trabalhos futuros de repovoamento planejado e sustentado da espécie na costa brasileira.

A reprodução de peixes em cativeiro também pode ser promovida por manipulação de fatores ambientais como o fotoperíodo e temperatura da água. No entanto a ecofisiologia de muitas espécies não é bem conhecida ou é impraticável simular as condições ambientais necessárias para o sucesso da reprodução, sendo assim o uso de hormônios e substâncias exógenas constituem um meio efetivo para se obter sucesso no processo reprodutivo (Mylonas et al., 2010). Os dados coletados no mar Mediterrâneo entre 1994 e 1997 envolvendo a captura de 432 animais de *E. marginatus* demonstraram que o processo de inversão sexual em ambiente natural pode ocorrer durante a maior parte do ano (Marino et al., 2001).

A família Serranidae é composta por aproximadamente 475 espécies distribuídas em todos os mares tropicais e subtropicais do mundo. São encontradas na zona entre marés, inclusive estuários, sobre a plataforma continental e início do talude (Heemstra e Randall, 1993). Menezes et al., (2003) citam 49 espécies de serranídeos no Brasil.

Em revisão da classificação da subfamília Epinephelinae fundamentada em análises utilizando técnicas da biologia molecular Craig e Hastings (2007) propõem uma nova classificação e inclusão de sete espécies anteriormente alocadas no gênero *Epinephelus* para o gênero *Mycteroperca* incluindo a garoupa verdadeira classificada como *E. marginatus*. Em nosso trabalho continuamos a nos referir a garoupa verdadeira como *E. marginatus* no aguardo de outros taxonomistas ratificarem essa nova classificação.

A garoupa verdadeira, *E. marginatus* (Serranidae, Epinephelinae), espécie hermafrodita protogínica monândrica é característica do litoral rochoso, vive desde águas rasas até profundidades de mais de 200 metros (Figura 4A). Sua distribuição é bastante ampla ocorrendo no litoral sudeste do Brasil, assim como no Mediterrâneo e no Atlântico leste; das Ilhas Virgens Britânicas a África do Sul, Açores, Madeira, Canárias e Cabo Verde (Barreiros, 1998).

Andrade et al., (2003) investigaram a biologia reprodutiva da garoupa verdadeira próximo a Reserva Biológica Marinha do Arvoredo (SC) e encontraram uma curva de primeira maturação sexual típica de espécies que atingem tamanhos maiores, apresentando grande longevidade. Este mesmo trabalho demonstrou que o comprimento estimado no qual 50% das fêmeas de *E. marginatus* atingem a primeira maturação é de 47 cm, com aproximadamente 2 kg de massa corpórea e que a maturação das gônadas ocorre na primavera e a desova no início do verão. Os mesmos autores observaram a inversão sexual natural das fêmeas em machos aos 80 cm com aproximadamente 15 kg, com fêmeas maiores apresentando comprimento total de 79 cm e amostras dos menores machos apresentando comprimento total de 80 cm.

No presente trabalho foram realizados três experimentos em condições assistidas em épocas do ano ou fase no ciclo reprodutivo diferentes, utilizando a mesma dose de IA para promover a inversão sexual de *E. marginatus* visando contribuir e aprimorar o conhecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos nesse processo.

Em vista deste cenário o conhecimento da biologia e fisiologia reprodutiva aliado ao desenvolvimento de técnicas que possam ser aplicadas ao processo de indução de reprodução de espécies com grande potencial econômico são fundamentais para alavancar as práticas de piscicultura marinha no Brasil, atividade em fase inicial de desenvolvimento e com muito a contribuir para a conservação de espécies nativas como a garoupa verdadeira.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- O objetivo geral do presente trabalho foi promover a inversão sexual de fêmeas adultas de *Epinephelus marginatus*, monitorando a expressão gênica de gonadotropinas (FSH e LH), o perfil dos hormônios esteroides e as alterações morfofisiológicas das gônadas ao longo deste processo.

2.2. Objetivos específicos

- Utilizar o inibidor de aromatase (Letrozole) para promover a inversão sexual de fêmeas adultas de *Epinephelus marginatus*;
- Determinar as alterações morfofisiológicas do tecido germinativo gonadal após a inversão sexual;
- Monitorar a inversão sexual utilizando-se das alterações na concentração dos esteroides gonadais ao longo do processo;
- Verificar se há alterações na expressão gênica de gonadotropinas (FSH e LH) que possam exercer influência no processo de inversão sexual;
- Determinar a época do ano ou fase no ciclo reprodutivo na qual o tratamento utilizando inibidor de aromatase é mais eficaz promovendo a inversão sexual e a espermição;
- Avaliar as características do sêmen dos machos invertidos após o final do processo de administração do inibidor de aromatase analisando-se o volume e qualidade do sêmen quanto à densidade e motilidade espermática.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Procedimento Experimental

Fêmeas de *E. marginatus* foram coletadas no ambiente natural entre a Ilha do Montão de Trigo município de São Sebastião-SP e o vilarejo do Pouso da Cajaíba no município de Parati-RJ, no litoral sudeste do Brasil. Os animais foram adquiridos junto à comunidade pesqueira da mesma região.

Foram realizados três experimentos utilizando-se o inibidor de aromatase Letrozole (lote: 080328 Venturepharm, Beijing, China) para promover a inversão sexual antecipada de *E. marginatus* em condições de cativeiro. O primeiro experimento teve seu início em 24 de outubro de 2009, na primavera; o segundo iniciou-se em 12 de janeiro de 2011, no verão e o terceiro experimento teve seu início no dia 23 de setembro de 2011 coincidindo com o primeiro dia da primavera.

Com base nos resultados de trabalhos prévios (Rodrigues-Filho, 2010) com os animais jovens foi estabelecido um cronograma de coleta de amostras de sangue e aplicação de novas doses de letrozole a cada 30 dias, até a verificação da ocorrência da inversão em um prazo de no máximo 90 dias.

3.1.1. Primeiro Experimento

Nesse primeiro experimento, no final de setembro (30-09-2009) dezoito animais foram anestesiados com quatro gramas de benzocaína previamente dissolvidas em álcool etílico e em quarenta litros de água do mar (Figura 4B); em cada animal foi aplicado um chip eletrônico de identificação (*tranponders*, TROVAN) no lado esquerdo da musculatura dorsal (Figura 5B) e em seguida registradas as seguintes medidas em uma biometria prévia:

- a) massa corpórea total (g),
- b) comprimento total (cm) - medida horizontal da ponta do focinho à maior extremidade da nadadeira caudal levemente distendida, estando o peixe sobre um ictiômetro com o lado esquerdo voltado para cima (Figura 5A).

Os animais foram estocados em dois tanques escavados separando o grupo controle do experimental, no município de Ilha Bela, São Paulo, por

um período mínimo de 20 dias de aclimação em uma densidade de cerca de 5 Kg/m³ (Figura 6A). Após esse período de aclimação os animais foram novamente anestesiados e 3,0 mL de sangue foram coletados da vasculatura caudal de cada animal utilizando-se seringas previamente heparinizadas (Heparina Sódica Liquemine- 5000UI).

O sangue retirado foi transferido para tubos *eppendorf* também heparinizados e levados a centrífuga a 2500 rpm por 5 minutos para a obtenção do plasma. O plasma obtido foi dividido em três alíquotas e armazenado em criotubos acondicionados em gelo seco em caixa de isopor para serem transportadas ao Laboratório de Metabolismo de Organismos Aquáticos (LAMEROA) no Departamento de Fisiologia IB-USP em São Paulo onde foi conservado em freezer -80° C. Essas amostras foram utilizadas para se estabelecer um grupo denominado aclimatado.

Nesse momento também se estabeleceu o procedimento experimental envolvendo um grupo controle com oito animais que recebeu 2,0 mL de óleo de fígado de bacalhau na cavidade abdominal e um grupo experimental (IA) com dez animais utilizando o mesmo óleo de fígado de bacalhau como veículo para a implantação do inibidor de aromatase (Letrozole), na dose de 100 mg/Kg na cavidade abdominal. O óleo de fígado de bacalhau foi eleito como veículo uma vez que a manteiga de cacau utilizada em boa parte dos trabalhos abordando inversão sexual se mostrou ineficaz, pois não ocorreu a absorção em nossas condições experimentais em experimentos piloto (Figura 6B).

Após 30 dias do início do experimento foi realizada uma nova coleta de amostras de sangue dos animais e a aplicação de nova dose de Letrozole (100 mg/Kg) e óleo de fígado de bacalhau nos grupos experimental e controle, respectivamente.

Após 60 dias, os animais foram novamente anestesiados e outra coleta de sangue foi realizada. Após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados lesionando-se a medula na altura do opérculo, sendo coletados também outros tecidos como músculo, fígado e gônadas de parte dos indivíduos do grupo experimental e do grupo controle. As amostras de fígado e músculo foram colocadas em criotubos e acondicionados em gelo seco em

caixa de isopor para serem transportadas a São Paulo onde foram conservadas em freezer -80° C no LAMEROA. As gônadas foram removidas e fixadas por um período de 20 a 24h em fixador indicado (Bouin acético) e após esse período foram preservadas em álcool 70%.

3.1.2. Segundo Experimento

O segundo experimento foi estabelecido em Dezembro de 2010 (20-12-2010) quando dezoito animais foram coletados na natureza na mesma região do litoral sudeste e submetidos ao processo de anestesia com benzocaína, aplicado o chip eletrônico de identificação (*tranponders*, TROVAN) na musculatura dorsal no lado esquerdo e em seguida registradas as medidas biométricas. Os procedimentos adotados foram semelhantes aos adotados no primeiro experimento.

Os animais foram estocados no Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar/USP) no município de São Sebastião-SP em dois tanques circulares com capacidade de dez mil litros, de laminado de PVC flexível, reforçado com fios de poliéster de alta tenacidade, atóxico (*Vinitank*, *Sansuy*) por um período mínimo de 20 dias de aclimação em uma densidade de cerca de 5 Kg/m³ (Figuras 7A e 7B).

Após esse período de aclimação foi adotado o mesmo procedimento experimental aplicado no primeiro experimento com a primeira coleta de sangue (grupo aclimatado) após o período de aclimação e o estabelecimento dos grupos experimental e controle. Após 30 dias houve nova coleta de sangue e aplicação de uma nova dose de IA no grupo experimental e apenas veículo no grupo controle.

Nesse experimento a coleta de sangue e de outros tecidos como músculo, fígado, gônadas e hipófise ocorreu após 60 dias do início do experimento, seguindo o mesmo protocolo já descrito no primeiro experimento. As amostras de fígado e músculo foram colocadas em criotubos e acondicionados em gelo seco em caixa de isopor para serem transportadas a São Paulo onde foram conservadas em freezer -80° C no LAMEROA. As gônadas foram removidas e fixadas por um período de 20 a 24h em Bouin acético e após esse período as gônadas foram preservadas em álcool 70%. As

hipófises foram acondicionadas acrescentando-se 500µl de trizol e congeladas em gelo seco e posteriormente mantidas em freezer -80° C.

3.1.3. Terceiro Experimento

O terceiro experimento foi estabelecido no início de Setembro de 2011 (02-09-2011) também no Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar) no município de São Sebastião-SP, quando doze animais coletados na natureza na mesma região do litoral sudeste citada nos experimentos anteriores foram submetidos ao processo de anestesia com benzocaína, aplicado o chip eletrônico de identificação (*tranponders*, TROVAN) na musculatura dorsal no lado esquerdo e em seguida registradas as medidas biométricas.

Após 20 dias de aclimação nos mesmos tanques circulares do segundo experimento, com capacidade de dez mil litros em uma densidade de cerca de 5 Kg/m³ o terceiro experimento foi iniciado com o mesmo procedimento experimental adotado no primeiro e segundo experimentos, com a primeira coleta de sangue após o período de aclimação (grupo aclimatado) e o estabelecimento dos grupos experimental e controle.

Após 30 dias do início do experimento houve nova coleta de sangue e a aplicação de uma nova dose de IA no grupo experimental e veículo no grupo controle. Após 60 dias do início do experimento houve uma nova aplicação de IA no grupo experimental e de veículo, óleo de fígado de bacalhau, no grupo controle.

Nesse experimento a coleta de sangue e dos demais tecidos, como músculo, fígado, gônada e hipófise ocorreu após 77 dias do início do experimento. As amostras de fígado e músculo foram colocadas em criotubos e acondicionados em gelo seco em caixa de isopor para serem transportadas a São Paulo onde foram conservadas em freezer -80° C no LAMEROA. As gônadas foram removidas e fixadas por um período de 20 a 24h em Bouin acético e após esse período foram preservadas em álcool 70%. As hipófises foram acondicionadas acrescentando-se 500µl de trizol e congeladas em gelo seco e posteriormente mantidas em freezer -80° C.

3.2. Análise histológica das gônadas

No momento da coleta, as gônadas foram removidas e fixadas por um período de 20 a 24h em Bouin acético e após esse período foram preservadas em álcool 70%. No laboratório as gônadas foram desidratadas, infiltradas e incluídas em *paraplast*. Foram efetuados cortes a 5µm de espessura em micrótomo (Leica RM 2255) que posteriormente foram corados com hematoxilina e eosina. As análises histológicas foram realizadas de acordo com métodos rotineiros (Behmer et al., 1976). As secções foram analisadas e documentadas pelo sistema computadorizado para análises de imagens (Câmera: Leica DFC 295; Programa Leica Application Suite V3).

3.3. Análise do sêmen

O sêmen fresco foi avaliado em relação ao volume, densidade e motilidade espermática. O sêmen foi coletado em seringas plásticas de um mL graduadas (0,01 mL) envoltas em papel opaco (para evitar a incidência da luz ambiente sobre as amostras) e ou com micropipeta automática de 1000 µl pressionando manualmente a região abdominal (Figuras 8A e 8B). O volume foi registrado e o sêmen mantido em água na mesma temperatura em que foram mantidos os animais evitando-se o contato com a água marinha para não ocorrer a ativação dos espermatozoides.

Desse volume foi retirada uma alíquota de 2µl e acrescentado o mesmo volume de água marinha para avaliar a motilidade em microscópio (Figura 8C). Na estimativa da motilidade, em microscópio óptico com contraste de fase (aumento de 400 x) (Figura 8D), empregou-se a escala arbitrária, de 0 a 100%, por onde foram considerados todos os espermatozoides que apresentaram movimento em um único campo focal, escolhido aleatoriamente, com a intensidade da luz mantida inalterada. A motilidade espermática foi estimada pelo número de espermatozoides móveis/número total de espermatozoides presentes no campo de microscopia multiplicado por cem e o resultado apresentado em porcentagem.

Retirou-se outra amostra de 2 µL de sêmen, que foi diluída em 2.000 µL de formol salino (5 mL de solução de formaldeído e 95 mL de água marinha a 35‰) resultando na diluição de 1:1000. Com o material diluído,

realizou-se a contagem de células espermáticas presentes em dez campos da câmara hematómica de Neubauer (Streit Junior et al., 2003; Bombardelli et al., 2006). Para a mensuração da concentração espermática (CSPZ) em câmara hematómica de Neubauer utilizou-se a fórmula descrita abaixo.

$$\text{CSPZ}(\text{SPZ.mL}^{-1}) = (\Sigma \text{SPZ} / 10q_c) \times 25q_t \times \text{diluição} \times 1000 / \text{profundidade da câmara (mm)}$$

SPZ= espermatozoides

ΣSPZ = número total de espermatozoides contados

q_c = número de quadrículos contados (10)

q_t = quadrículos totais (25)

profundidade da câmara = 0,1mm

diluição = fator de diluição do sêmen pelo fixador (1000)

O restante do sêmen foi acondicionado em um único frasco plástico opaco graduado e mantido tampado e imerso em recipiente com água na mesma temperatura em que foram mantidos os animais para se realizar o processo de criopreservação.

3.4. Perfil plasmático dos esteroides gonadais

No LAMEROA, o plasma sanguíneo foi descongelado para a quantificação dos hormônios esteroides: 17 β -estradiol (E2) (Interkit), testosterona (T) (Interkit), 17 α - hidroxiprogesterona (17 α -OHP) (Interkit) e 11ceto-testosterona (*Cayman Chemicals*) utilizando kits de Elisaimunoensaio. As análises foram conduzidas de acordo com as orientações dos fabricantes e as leituras das amostras foram realizadas em microplacas no espectrofotômetro Spectra Max 250 Molecular Devices.

3.5. Desenho experimental das análises moleculares: Estudo da expressão gênica de FSH, LH e fator de alongação EF1 α .

3.5.1. Padronização Experimental

Utilizou-se uma hipófise de *E. marginatus* congelada com 500 μ L de trizol com o objetivo de se padronizar a análise das amostras. Essa hipófise foi coletada previamente de uma garoupa capturada na natureza e não fazia parte dos grupos experimentais do trabalho de inversão sexual.

A hipófise foi descongelada, macerada e realizada a extração do RNA total, utilizando-se o reagente Trizol Reagent (Invitrogen). O RNA obtido da hipófise foi tratado com DNA-ase (Promega) e realizada uma nova extração do RNA total utilizando-se o reagente Trizol LS Reagent (Invitrogen).

Para a obtenção de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total utilizou-se a enzima transcriptase reversa (Fermentas Life Sciences #EP0451). Do produto da reação de transcrição reversa (DNA complementar – cDNA) foi conduzida uma reação de amplificação com iniciadores degenerados descritos por Parhar et al., (2003) da subunidade β das glicoproteínas FSH e LH em nove temperaturas de associação dos oligonucleotídeos (52.7; 53.6; 54.7; 56.1; 57.7; 58.8; 60.1; 61.2; 62.0°C) com o objetivo de se verificar a melhor condição experimental para a obtenção do produto da reação da polimerase em cadeia (PCR- *polymerase chain reaction*) para β FSH (Figura 9) e β LH (Figura 10).

Após este processo, os fragmentos gerados pela PCR, tendo o tamanho de pares de bases nitrogenadas equivalentes ao esperado, foram ligados ao vetor plasmidial pGEM (pGEMTEasy Vector Systems - Promega) e realizado o processo de transformação bacteriana, utilizando-se *Escherichia coli* competentes crescidas a 37°C por 24h em meio SOB sólido com ampicilina, isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo (X-gal).

Das bactérias transformadas, foram selecionadas colônias que continham o plasmídeo ligado ao fragmento correspondente ao FSH e colônias que continham o plasmídeo ligado ao fragmento correspondente ao LH. O desenvolvimento de cada um destes clones ocorreu em meio líquido

SOB com ampicilina e então foi realizada a extração do DNA plasmidial (mini-prep) por lise alcalina com SDS (Sambrook e David, 2001). O DNA plasmidial extraído de cada clone foi diluído em 50 µl de TE (tampão Tris-EDTA) e 2 µl desta solução foram submetidos a reação de digestão plasmidial com a enzima NOT (Fermentas Life Science) de acordo com a instrução do fornecedor a fim de se verificar a presença do vetor e o tamanho do fragmento inserido. Esta análise foi realizada por eletroforese comparando-se o DNA plasmidial digerido e não digerido (Figura 11).

Os clones contendo o fragmento de interesse foram submetidos à reação de seqüência utilizando-se o tampão Save Money (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl₂), o *Big Dye V3.0* (Applied Biosystem), primer T7 ou SP6 (3.2 µM, Invitrogen), sendo os dois oligos utilizados para todos os clones em reações distintas, e água. A reação foi submetida ao termociclador nas seguintes condições: 96°C por 90 segundos, seguidos de 49 ciclos de 96°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após este processo, o DNA marcado foi precipitado com uma solução de etanol, NaOAc 3M pH 5,2 e glicogênio, terminada a precipitação as amostras foram secas a 96°C por 2 minutos em termociclador. Estas amostras foram submetidas a um sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystem), no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os cromatogramas resultantes foram analisados com o auxílio do programa *Bioedit Sequence Alignment Editor*, e os clones de mesma natureza foram tratados eliminando-se o vetor e os oligos, então as seqüências foram alinhadas par a par (seqüência 5' - 3' e seu reverso complemento), e uma a uma analisada no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) comparando com as seqüências já existentes no banco de dados do GenBank.

Determinada a seqüência de FSH e LH, foram desenhados *primers* internos à seqüência gerada, e específicos para a realização dos experimentos de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Foi utilizado o programa oligocalc (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html) e o programa Invitrogen-Perfect Primer Design with Invitrogen's OligoPerfect™ Designer (<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=971>) levando em consideração os seguintes fatores: o tamanho do fragmento,

que juntamente com os *primers*, deve ter aproximadamente 100pb; os *primers forward* e *reverse* devem apresentar temperatura de desnaturação (*melting temperature-Tm*) muito próximas, isto é, devem ser próximas a temperatura na qual 50% dos oligonucleotídeos e seu complemento perfeito estão associados. Esta característica tem relação com o conteúdo de bases C e G; sendo ideal que a última base da região 3' seja C ou G por apresentarem três ligações de hidrogênio com sua base complementar tornando a associação mais estável; e devem ser checados quanto a existência de complementaridade entre eles e neles mesmos.

Para o fator de alongação 1 α (EF1 α), gene utilizado como normalizador, as sequências de oligonucleotídeos de *Epinephelus bruneus*, *Mycteroperca rosacea*, *Epinephelus septemfasciatus* e *Epinephelus coiodes*, quatro espécies da família dos serranídeos foram alinhadas com o auxílio do programa *Bioedit Sequence Alignment Editor*. A partir de regiões conservadas em pelo menos três dessas espécies citadas foram construídos dois *primers forward* e *reverse*; BMC-(*E. bruneus*, GenBank: JF430667.1; *M. rosacea*, GenBank: JN574476.1; *E. coiodes*, GenBank: HQ441076.1) e BSM (*E. bruneus*, *E. septemfasciatus*, GenBank: AB604609.1 e *M. rosacea*) sem degenerações levando-se em consideração os mesmos fatores descritos acima para a construção dos *primers* de FSH e LH para qPCR utilizando-se o programa *oligocalc* (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html) e o *Invitrogen – Perfect Primer Design with Invitrogen’s OligoPerfect™ Designer* <http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>.

Do produto da reação de transcrição reversa (DNA complementar – cDNA) foi conduzida uma reação de amplificação com os *primers* descritos acima em seis temperaturas de associação (55.0; 55.7, 57.8, 60.5, 63.1, 65°C) com o objetivo de se verificar a melhor condição experimental para a obtenção do produto da reação da polimerase em cadeia (PCR- *polymerase chain reaction*) para o fator de alongação 1 α (EF1A)(Figura12).

Após este processo, os fragmentos gerados pela PCR, tendo o tamanho de pares de bases nitrogenadas equivalentes ao esperado, foram ligados ao vetor plasmidial pGEM (pGEMTEasy Vector Systems - Promega) e utilizada a

mesma metodologia descrita acima para a obtenção da sequência do gene normalizador (EF1A) (Figura 13).

3.5.2. Experimentos de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A qRT-PCR é uma técnica de quantificação absoluta ou relativa de expressão gênica. Basicamente a amplificação do gene alvo é monitorada pela fluorescência do SYBR Green ou da sonda Taqman (Swillens et al., 2008).

Padronizados todos os procedimentos para a análise experimental, as hipófises dos animais experimentais foram descongeladas, maceradas e realizadas a extração do RNA total, utilizando-se o reagente Trizol Reagent (Invitrogen). O RNA obtido da hipófise foi tratado com DNA-ase (Promega) e realizado uma nova extração do RNA total utilizando-se o reagente Trizol LS Reagent (Invitrogen). Após a quantificação do RNA total das amostras utilizou-se a enzima transcriptase reversa (Fermentas Life Sciences #EP0451) para a obtenção de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total. Esta reação foi efetuada a partir de 500ng de RNA de acordo com as instruções do fabricante realizando-se também o controle negativo de cada reação com a ausência da enzima de transcrição reversa.

Para a quantificação absoluta dos genes em estudo foi realizada uma curva padrão com pontos correspondentes ao número de cópias para FSH, LH e EF1 α (Castilho et al., 2008) utilizando este último como normalizador segundo Olsvik et al. (2005). Para o EF1 α ser considerado normalizador para os genes FSH e LH as condições experimentais, como reagentes e momento da ciclagem no termobloco, foram as mesmas. Na quantificação absoluta, o mRNA foi quantificado através de um padrão adequado de concentração conhecida (como o DNA plasmidial contendo um inserto do gene alvo) diluído em série para o estabelecimento de uma curva padrão. O DNA plasmidial pGEM-T Easy Vector de 3015bp contendo os insertos foi tratado com a enzima Scal linearizando o vetor pelo lado oposto ao do inserto. O tamanho do fragmento gerado foi constatado no gel de agarose a 2% (Figura 14).

A banda referente ao produto formado foi extraída do gel e purificada (Protocolo Bench:QIAquick Gel Extraction-QIAGEN). A concentração de DNA (ng/ μ L) foi determinada em triplicata. Sendo conhecido o tamanho do plasmídeo com o inserto (peso molecular do plasmídeo e do inserto) converteu-se a concentração obtida em ng/ μ L para número de cópias correspondente a dez elevados a dez cópias do gene de interesse. Realizaram-se diluições seriadas a partir dessa solução mãe correspondente a dez elevados a dez cópias para a construção da curva padrão de cada gene, até a massa correspondente a uma única cópia.

A qRT-PCR permite a quantificação dos produtos amplificados em tempo real através da emissão de sinal fluorescente e possui maior precisão e reprodutibilidade pois determina os valores na fase exponencial da reação. Durante os ciclos iniciais, o sinal de fluorescência é fraco e não pode ser distinguido da fluorescência basal (*background*). O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de ciclo *Threshold* (Figura 15). A emissão dos compostos fluorescentes está diretamente relacionada à quantidade de DNA amplificado (produto da PCR) (Novais et al., 2004). A curva padrão produz uma relação linear entre os valores de Ct e a quantidade inicial da amostra, permitindo a determinação da concentração de amostras desconhecidas com base em seus valores de Ct (Bustin, 2000; Wong e Medrano, 2005). Tal quantificação permite investigar mudanças fisiológicas na expressão gênica (Pfaffl e Hageleit, 2001).

As reações foram feitas em placas de 96 poços, sendo adicionado a cada placa uma diluição serial em triplicata do DNA plasmidial para formar a curva padrão, seis controles negativos (água ultra-pura), e as amostras de cDNA em duplicata a serem analisadas. Para cada 25 μ L de reação de amplificação foram usados, 7,95 μ L de água, 12,5 μ L de máxima, 0,05 μ L de rox, 0,75 μ L de cada *primer* (10,0 μ M), 3 μ L de cDNA. A reação foi amplificada em um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguidos de 50 ciclos de 94°C por 30 segundos e 60°C por 20 segundos.

A análise dos dados e a determinação do número de cópias das amostras foram feitas no termociclador Exicycler™96 através do software Exicycler Diagnosis3.

3.6. Proteínas Totais

As amostras de músculo esquelético e fígado foram precipitadas em 5 volumes de ácido perclórico (PCA) a 6%, centrifugadas a 11100 g por 5 min e o precipitado ressuspenso 3 vezes em 4 volumes de PCA a 6%. O precipitado resultante foi tratado com 14 volumes de hidróxido de potássio a 2,5%, sob agitação, até atingir a completa solubilização, por cerca de 24h. O solubilizado foi utilizado inicialmente para testar diferentes diluições, haja vista que não existem dados na literatura para a concentração de proteínas nestes tecidos, nesta espécie. Foi adotada a diluição de 100 vezes para os tecidos muscular e hepático, que foram utilizados para a determinação das proteínas totais de acordo com o método de Lowry et al., (1951) modificado para espectrofotômetro de placa.

Após a adição de mistura reativa e reativo de Folin-Ciocalteu, uma alíquota de 300µL foi transferida para uma placa de elisaimunoensaio e realizada a leitura das amostras no espectrofotômetro Spectra Max 250 Molecular Devices, no comprimento de onda de 660 nm, a partir de uma curva padrão de albumina sérica bovina. O mesmo procedimento, porém sem extração prévia, foi empregado para o plasma, após a diluição de 300 vezes.

3.7. Análise Estatística

Para realizar as análises estatísticas foi utilizado o programa SigmaStat 3.5. A concentração plasmática dos esteroides assim como as concentrações de proteínas do plasma e demais tecidos analisados foram comparadas entre o grupo experimental e o controle, utilizando-se o teste de Análise de Variância (one-way ANOVA). Quando foram detectadas diferenças entre grupos foi aplicado o teste de comparações múltiplas Holm-Sidak, indicado pelo programa.

Os dados da concentração plasmática dos esteroides também foram submetidos ao teste de Análise de Variância (one-way ANOVA) para medidas repetitivas (RM ANOVA) dentro do mesmo experimento, para se observar a influência do tratamento ao longo do tempo no mesmo grupo de animais.

4. RESULTADOS

4.1. Primeiro experimento

Foram utilizados animais com massa corpórea média de $1723,8 \pm 218,6$ g, variando entre 974 e 3770 g. O comprimento total variou entre 40 e 60 cm com uma média de $47,4 \pm 1,6$ cm. A temperatura média da água ao longo do experimento foi de $27,4 \pm 0,15$ °C apresentando a temperatura mais elevada de $28,4$ °C no final do mês de Novembro.

Com o cálculo do índice gonadossomático (IGS) foi possível detectar uma diminuição significativa na massa das gônadas dos animais que passaram pelo processo de inversão sexual com IA (grupo experimental) em relação à massa das gônadas dos animais do grupo controle que se mantiveram no sexo feminino. Não foi detectada diferença significativa nos dados calculados para o índice hepatossomático dos animais do grupo controle e experimental (Tabela 1).

Após 35 dias do início do experimento foi constatado um comportamento anormal em um único animal do grupo experimental, esse indivíduo nadava de forma errática, meio sem coordenação nadando com a cabeça pra fora d'água; foi capturado para uma observação mais detalhada e sua papila genital apresentava leve intumescimento. Com a introdução de uma cânula na papila genital observou-se uma pequena quantidade de sêmen. Após esse procedimento o animal foi reintroduzido no tanque, mas não resistiu e morreu; não foi possível a retirada das gônadas e do sangue desse animal.

Após 60 dias do início do experimento a inversão foi evidenciada pela espermição em todos os animais do grupo experimental.

4.1.1. Análises histológicas das gônadas

As gônadas de *E. marginatus* apresentam-se aos pares, são órgãos saculiformes localizados dorsalmente na cavidade celomática (Figuras 16A e B). Apresentam basicamente duas regiões bem distintas, a cápsula gonadal com a presença de vasos sanguíneos e as lamelas do tecido germinativo avascular entremeado pelo estroma (Figuras 17A e C).

No grupo controle foram encontradas gônadas em estágio inicial de maturação, com ovócitos em crescimento primário com um único nucléolo (Figuras 17 C e E) e ovócitos apresentando um número variável de nucléolos localizados na região central do núcleo, além de nucléolos que migraram para a periferia do núcleo (crescimento primário perinucleolar) (Figuras 17B, D e F). Esses animais apresentaram uma arquitetura gonadal típica de fêmeas em estágios iniciais do ciclo reprodutivo apresentando ninho de ovogônias bem evidentes, células caracterizadas pelo pequeno tamanho, disposição em grupos formando ninhos e a presença de células pré-foliculares delimitando a periferia dos ninhos. Após um período de crescimento as ovogônias iniciam o processo de meiose originando os ovócitos que deixam os ninhos e já no compartimento germinativo completam o desenvolvimento ovariano (Figuras 17C, D e F).

Após 60 dias do início do experimento, os animais do grupo experimental apresentaram uma desorganização gonadal peculiar, mas ainda foram observadas as lamelas características de ovário (Figura 18A), no entanto em seu interior observava-se compartimento intersticial desenvolvido com cistos de células germinativas masculinas em estágios avançados da espermatogênese (espermátócitos, espermátides) (Figuras 18B, C e D), células de Sertoli e grande quantidade de cistos rompidos com a liberação de espermatozoides no lúmen (Figuras 18D, E e F).

Esse tipo de arquitetura corrobora a constatação da inversão sexual, inclusive com espermição, mesmo que em pequeno volume. É importante também destacar que apesar de ainda mantida a estrutura lamelar característica de ovários, comumente encontrada em espécies monândricas, a presença de células germinativas femininas é muito reduzida, apresentando somente ovócitos em degeneração (Figuras 18C, D e E).

4.1.2 Análise do sêmen

O sêmen obtido foi avaliado em relação ao seu volume, densidade e motilidade espermáticas. O volume de sêmen coletado variou entre 10 μ L a 250 μ L apresentando uma densidade espermática que variou entre 75 x 10⁶/mL a 370 x 10⁶/mL, apresentando motilidade de 50% (Tabela 2). A

análise do sêmen foi prejudicada por contaminação, provavelmente de urina; no momento da coleta.

4.1.3 Perfil dos esteroides gonadais

Testosterona (T)

Trinta dias após o início do experimento houve uma elevação significativa nos níveis de testosterona plasmática nos animais dos grupos controle e experimental em relação ao momento aclimatado nos mesmos grupos. Essa alteração na concentração de testosterona plasmática não foi significativa entre os animais do grupo experimental (IA) e em seu respectivo grupo controle.

Após 60 dias do início do experimento os animais do grupo experimental apresentaram um valor significativamente mais elevado na concentração plasmática de testosterona em relação aos animais de seu respectivo grupo controle (Figura 19A).

Estradiol (E₂)

Após 30 dias do início do experimento não houve alteração na concentração de estradiol plasmático nos animais dos grupos controle e experimental em relação ao momento aclimatado.

Após 60 dias observou-se o aumento na concentração de estradiol plasmático nos animais dos grupos controle e experimental, sendo detectada diferença significativa entre as concentrações obtidas nesses grupos em relação ao momento inicial, aclimatado. Para este hormônio não foi detectada diferença significativa entre os animais do grupo controle e do grupo experimental em nenhum momento do experimento (Figura 19B).

11 Ceto-Testosterona (11KT)

Após 30 dias de experimento houve um aumento significativo na concentração de 11KT plasmática nos animais do grupo experimental (IA) quando comparada com a concentração encontrada nos animais do grupo aclimatado. Nesse momento a concentração encontrada para os animais do

grupo experimental (IA) também foi significativamente maior que a encontrada nos animais do grupo controle.

Decorridos 60 dias, o grupo experimental apresentou uma redução significativa na concentração plasmática de 11KT em relação aos valores encontrados no mesmo grupo em 30 dias, aproximando-se dos valores obtidos para este grupo no início do experimento, aclimatado. Não foram obtidas variações significativas na concentração de 11KT plasmática para o grupo controle ao longo dos 60 dias do experimento (Figura 19C).

17-alfaOHprogesterona (17 α -OHP)

Após 30 dias do início do experimento a concentração de 17-alfaOHprogesterona plasmática apresentou uma elevação significativa em ambos os grupos, controle e experimental (IA) em relação aos valores encontrados no momento aclimatado.

Decorridos 60 dias de experimento os valores foram mantidos e notou-se que o grupo experimental apresentava uma concentração de 17 α -OHP mais elevada que a encontrada para o grupo controle, evidenciando-se uma diferença significativa entre os dois grupos somente nesse momento do experimento (Figura 19D).

4.1.4 Proteínas totais

A concentração de proteínas totais no músculo, fígado e plasma dos animais do grupo experimental não apresentaram diferença significativa em relação aos valores encontrados nos animais do grupo controle decorridos os sessenta dias experimentais (Figuras 20A, B, C).

4.2. Segundo Experimento

No experimento implantado no verão de 2010 os animais apresentaram a massa corpórea média de $1476,47 \pm 80,11$ g, variando entre 1000 e 2250 g. O comprimento total variou entre 37 e 51 cm com uma média de $42,3 \pm 0,85$ cm. A temperatura média ao longo do experimento foi de $26,8 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$ apresentando a temperatura mais elevada de 29°C no final de Janeiro/2011.

Os valores calculados para o IGS não apresentaram diferença significativa entre os animais tratados com inibidor de aromatase (grupo experimental) em relação aos dados obtidos para os animais do grupo controle. Da mesma forma, não foi detectada diferença significativa nos dados calculados para o IHS nesse experimento (Tabela 3).

Decorridos 60 dias após o início do experimento nenhum dos animais do grupo experimental apresentou características marcantes da ocorrência de inversão sexual e consequentemente da produção de sêmen e espermatozoides. Devido a dificuldades em manter os animais nos tanques em condições saudáveis, optamos por encerrar o experimento nesse momento.

4.2.1. Análises histológicas das gônadas

No grupo controle os animais apresentaram uma arquitetura gonadal típica de fêmeas em estágio inicial de maturação, estrutura lamelar, com cápsula gonadal apresentando aglomerados de células produtoras de esteroides próximos de vasos sanguíneos bem evidentes (Figuras 21A e B). Foram encontrados ovócitos em crescimento primário com um único nucléolo e ovócitos apresentando um número variável de nucléolos localizados na região central do núcleo, além de nucléolos que migraram para a periferia do núcleo (crescimento primário perinucleolar) e ninho de ovogônias bem evidentes (Figuras 21C, D e F).

Nas gônadas dos animais do grupo experimental foi observada uma ligeira desorganização da arquitetura gonadal, região que apresenta um número grande de ovócitos em degeneração, proliferação de tecido intersticial e início de formação de cistos de células masculinas,

principalmente sítios de desenvolvimentos de espermatócitos, estágio inicial do desenvolvimento das células germinativas masculinas (Figuras 22A a F). Esses resultados com cistos em formação e ovócitos em degeneração demonstram que ao longo do processo de inversão sexual pode haver uma fase de intersexo.

4.2.2. Perfil dos esteroides gonadais

Testosterona (T)

Não foram obtidas variações significativas nos teores de testosterona plasmática para os animais do grupo experimental (IA) ao longo dos 60 dias do experimento. No entanto, no grupo controle, a concentração de testosterona foi reduzida com 30 dias de experimento, retornando aos valores iniciais aos 60 dias. Essa queda na concentração de testosterona no grupo controle contribuiu de maneira decisiva para a diferença significativa encontrada nesse momento entre o grupo controle e experimental.

Decorridos 60 dias após o início do experimento houve uma nova variação significativa do teor obtido para o grupo controle em relação ao teor obtido em 30 dias para o mesmo grupo, ocorreu um aumento que elevou o teor de testosterona para um patamar próximo ao momento aclimatado (Figura 23A).

Estradiol (E₂)

No início do experimento, no momento aclimatado, a concentração plasmática obtida nos animais do grupo controle apresentou-se mais elevada que a apresentada para os animais do grupo experimental estabelecendo uma diferença significativa entre os teores dos grupos nesse momento.

Após o período de aclimação e início do experimento a concentração de estradiol plasmática no grupo controle se manteve inalterada, aumentando apenas após 60 dias do início do experimento com uma diferença significativa para esse grupo de animais em relação à concentração observada em 30 dias e no momento inicial, aclimatado.

No grupo experimental a concentração mais elevada foi obtida após 30 dias do início do experimento; esse aumento estabeleceu uma diferença

significativa em relação à concentração encontrada no momento aclimatado, início do experimento. Decorridos 60 dias houve uma manutenção dos valores nos animais do grupo experimental e uma elevação nos animais do grupo controle (Figura 23B).

11 Ceto-Testosterona (11KT)

Não foram obtidas variações significativas nas concentrações de 11KT plasmática para os animais dos grupos controle e experimental (IA) ao longo dos 60 dias do experimento. Também não foram observadas diferenças significativas entre os valores obtidos no grupo controle em relação aos obtidos no grupo experimental ao longo de todo o experimento (Figura 23C).

17-alfaOHprogesterona (17 α -OHP)

Após o período de aclimação e início do experimento a concentração de 17-alfaOHprogesterona plasmática apresentou uma diminuição significativa nos animais de ambos os grupos, controle e experimental (IA), com 30 dias de experimento.

Decorridos 60 dias, os mesmos valores do período anterior foram mantidos, no entanto os animais do grupo experimental apresentavam uma concentração mais elevada que os animais do grupo controle, evidenciando-se uma diferença significativa entre os dois grupos nesse momento (Figura 23D).

4.2.3. Padronização nos experimentos de expressão gênica.

De modo geral ocorreu uma boa associação dos *primers* degenerados utilizados para β FSH. O produto de amplificação obtido nas temperaturas de 53,6 e 57,7° C foi utilizado na reação de ligação (Figura 9). Para associação dos *primers* degenerados utilizados para β LH o produto de amplificação obtido na temperatura de 58,8° C foi utilizado na reação de ligação (Figura 10).

A sequência encontrada para o gene de FSH (Figura 24) foi comparada no banco de dados <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> e foi encontrada uma similaridade de 98 a 99% com as espécies congênicas. Utilizando-se

da mesma ferramenta de comparação foi encontrada uma similaridade de 97 a 100% para a sequência encontrada para o LH (Figura 10) com espécies congêneras presentes no banco de dados.

O *primer* interno para FSH foi desenhado para se ligar à base 73 a 168 do produto de PCR gerando um fragmento de 95 pares de base.

Primers-FSH

FSH (forward) - A G T T T C T G G C C A C A G G G T A G

FSH (reverse) - G G G C T G A A C A G A A A G T C T G C

O *primer* interno para LH foi desenhado para se ligar à base 29 a 129 do produto de PCR gerando um fragmento de 100 pares de base.

Primers-LH

LH (forward) - G T C A C C C A G T G G A A A C A A C C

LH (reverse) - G T A C G T G C A C A C A T G C T G G T

Os *primers* desenhados para o fator de alongação 1 α (EF1 α) foram utilizados tanto para o PCR como para a realização dos experimentos de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

Primers- EF1 α

BMC (forward) - T C G G A G G T A T T G G A A C T G

BMC (reverse) - C C T C A G T G G T C A G G T T G C

BSM (forward) - T G G T A C C T C T C A G G C T G A C

BSM (reverse) - A C C A A G G G T G A A G G C C A G

O produto de amplificação obtido na temperatura de 57,8° C foi utilizado na reação de ligação (Figura 12).

4.2.4. Experimentos de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

As figuras 25A e B mostram respectivamente a comparação entre as quantificações do número de cópias de RNAm no grupo controle e experimental (IA) para os genes de FSH e LH respectivamente. Não foi

detectada diferença estatística entre os número de cópias de RNAm dos grupos controle e experimental para a expressão dos genes investigados.

As figuras 25C e D comparam as quantificações do número de cópias de RNAm de FSH e LH no grupo controle e no grupo experimental respectivamente. Também não houve diferença significativa na comparação entre o número de cópias do FSH em relação ao número de cópias do LH no grupo controle e nem no grupo experimental (IA).

4.2.5. Proteínas totais

As concentrações de proteínas totais encontrados no fígado e plasma dos animais do grupo experimental não apresentaram diferença significativa em relação aos animais do grupo controle. No entanto, o resultado obtido para a concentração de proteínas totais do músculo dos animais do grupo experimental apresentou um aumento significativo em relação à concentração encontrada nos animais do grupo controle (Figuras 26A, B e C).

4.3. Terceiro Experimento

No terceiro experimento foram utilizados animais com massa corpórea média de $2142,2 \pm 41,3$ g, variando entre 1900 e 2348 g. O comprimento total variou entre 48 e 54,5 cm com uma média de $50,4 \pm 0,6$ cm. A temperatura média ao longo do experimento foi de $22,4 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ apresentando a temperatura mais elevada de $24,1^{\circ}\text{C}$ nos meados do mês de Novembro.

Os dados obtidos para o IGS demonstram uma diminuição significativamente nos valores para os animais que passaram pelo processo de inversão sexual com IA (grupo experimental) em relação aos animais do grupo controle que se mantiveram com o sexo feminino. Não foi detectada diferença significativa no IHS dos animais do grupo controle e experimental (Tabela 4).

Decorridos 60 dias após o início do experimento nenhum dos animais do grupo experimental apresentava-se com características marcantes da ocorrência de inversão e conseqüentemente da produção de sêmen e espermatozoides. Nesse momento decidiu-se pela aplicação de mais uma dose de inibidor de aromatase. Após 70 dias do início do experimento ocorreu a morte de um indivíduo do grupo experimental e após 77 dias do início do experimento a inversão foi evidenciada pela espermição em todos os animais do grupo experimental.

4.3.1. Análises histológicas das gônadas

No grupo controle os animais apresentaram uma arquitetura gonadal típica de fêmeas em estágio inicial de maturação e um estágio mais avançado de crescimento primário. Foram encontrados ovócitos em crescimento primário com um único nucléolo e ovócitos apresentando um número variável de nucléolos localizados na região central do núcleo e nucléolos que migraram para a periferia do núcleo (crescimento primário perinucleolar) e ovócito cortical alveolar e ninho de ovogônias bem evidentes (Figuras 27A a F).

O ovócito cortical alveolar apresenta vacúolos na periferia do citoplasma próximo à membrana celular. Concomitante às vesículas, essa

célula apresenta um maior desenvolvimento das células foliculares e da zona radiata em relação aos estágios anteriores de desenvolvimento ovocitário (Figuras 27E e F).

Após 77 dias do início do experimento, os animais do grupo experimental apresentaram uma desorganização gonadal peculiar, foram observadas as lamelas características de ovário (Figura 28A), no entanto em seu interior observava-se compartimento intersticial desenvolvido com cistos de células germinativas masculinas em estágios avançados da espermatogênese (espermatócitos, espermátides) (Figuras 28B, C e D), células de Sertoli e grande quantidade de cistos rompidos com a liberação de espermatozoides no lúmen com poucos ovócitos em degeneração (Figuras 28E e F).

4.3.2. Análise do sêmen

O sêmen obtido foi avaliado em relação a seu volume, densidade e motilidade espermáticas. O volume de sêmen coletado variou entre 20µL a 275 µL apresentando uma densidade espermática que variou entre $4,4 \times 10^9$ /mL a $17,6 \times 10^9$ /mL apresentando uma motilidade acima de 90% (Tabela 5).

4.3.3. Perfil dos esteroides gonadais

Testosterona (T)

Não foram obtidas variações significativas na concentração de testosterona plasmática para os animais do grupo controle ao longo dos 77 dias do experimento.

Após 77 dias do início do experimento foi encontrado um aumento significativo na concentração de testosterona plasmática nos animais do grupo experimental em relação ao grupo controle e em relação aos animais experimentais amostrados anteriormente (Figura 29A).

Estradiol (E₂)

A concentração de estradiol nos animais do grupo experimental não apresentou diferença significativa ao longo dos 77 dias de experimento.

Após 77 dias do início do experimento foi encontrado um aumento significativo na concentração de estradiol plasmático nos animais do grupo controle, sendo estatisticamente superior aos animais experimentais neste momento, assim como aos animais do grupo controle amostrados anteriormente (Figura 29B).

11 Ceto -Testosterona (11KT)

Após 30 dias do início do experimento foi encontrado um aumento na concentração 11KT plasmático nos animais do grupo experimental. Nesse momento o valor foi significativamente maior em relação à concentração encontrada nos animais do grupo controle

Não foram obtidas variações significativas nas concentrações de 11KT plasmático dentre os animais dos grupos controle e experimental ao longo dos 77 dias do experimento (Figura 29C).

17-alfaOHprogesterona (17 α -OHP)

Após o período de aclimação e início do experimento a concentração de 17-alfaOHprogesterona plasmática apresentou uma diminuição significativa nos animais do grupo controle.

Decorridos 77 dias de experimento notou-se que os animais do grupo experimental apresentavam uma concentração mais elevada que a encontrada nos animais do grupo controle, evidenciando-se uma diferença significativa entre os dois grupos nesse momento (Figura 29D).

4.3.4. Experimentos de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

As figuras 30A e B mostram as quantificações do número de cópias de RNAm nos animais do grupo controle e experimental (IA) para os genes de FSH e LH, respectivamente. Foi detectado um número de cópias de RNAm significativamente maior nos animais dos grupos controle em relação ao

número de cópias encontrados nos animais do grupo experimental (IA) em ambos os genes investigados.

As figuras 30C e D comparam as quantificações do número de cópias de RNAm de FSH e LH no grupo controle e no grupo experimental respectivamente. Não houve diferença significativa na comparação entre o número de cópias do FSH em relação ao número de cópias do LH no grupo controle. Já no grupo experimental o número de cópias encontradas para a expressão do LH apresentou-se significativamente maior que o número de cópias encontradas para a expressão do FSH.

4.3.5. Proteínas totais

Os teores de proteínas totais obtidos no músculo, fígado e plasma dos animais do grupo experimental não apresentaram diferença significativa em relação aos encontrados nos animais do grupo controle (Figuras 31A, B e C).

5. Discussão

Pelo fato de apresentarem uma estação de desova bem definida com agregação na época reprodutiva, as espécies de Serranídeos hermafroditas protogínicos são mais vulneráveis a pesca quando comparados aos peixes dióicos. Por esta razão o conhecimento do comportamento e da biologia reprodutiva dessas espécies, inclusive da garoupa verdadeira *E. marginatus*, é considerado essencial para a domesticação, manejo e principalmente para a tomada de decisões conservacionistas sustentáveis visando a preservação dessas espécies (Zabala et al., 1997; Coleman et al., 2001).

A garoupa verdadeira *E. marginatus* é uma das espécies marinhas que apresenta grande potencial para o desenvolvimento da aquicultura e merece uma atenção especial, pois sua população no Estado de São Paulo já se encontra sobreexplorada (Rodrigues-Filho et al., 2009). Os machos de *E. marginatus* são de tamanhos maiores e a pesca comercial desta espécie vem capturando cada vez mais indivíduos de comprimentos menores (comunicação pessoal com pescadores) (Figura 32).

Em estudo no ambiente natural com *E. marginatus* do Mediterrâneo sudeste, Marino et al. (2001) encontraram fêmeas funcionais a partir de 36,7 a 97,0 cm, machos de 68,5 a 105,0 centímetros e estimaram o comprimento médio de primeira maturação (L50) em 43,8 cm para fêmeas e 81,3 cm para machos. Os ovários apresentaram-se aos pares como órgãos saculiformes compostos por dois lobos desiguais que se fundem na porção médio - caudal localizados dorsalmente na cavidade celomática. Os testículos apareceram como pequenas gônadas cinzentas suaves, esparsamente vascularizadas de parede geralmente mais espessa do que nas fêmeas.

Como não há dados da biologia reprodutiva da garoupa-verdadeira na região Sudeste do Brasil, levaremos em consideração o trabalho de Andrade et al., (2003) que estudaram a biologia reprodutiva de garoupas na costa de Santa Catarina e como citado anteriormente, este trabalho demonstrou que o comprimento estimado no qual 50% das fêmeas de *E. marginatus* atingem a primeira maturação é de 47 cm, com aproximadamente 2 kg de massa corpórea. Estes autores também observaram que os maiores valores do

índice gonadossomático (IGS) ocorrem no verão, com uma diminuição no outono e uma recuperação desses valores ao longo do inverno e da primavera. Já o índice hepatossomático (IHS) apresentou um padrão inverso daquele encontrado para o IGS sendo nítida a recuperação do fígado (elevação do IHS) no outono. Esses dados aliados às alterações histológicas nas gônadas observadas ao longo do ciclo sexual sugeriram que para essa espécie o período de maturação final das gônadas se dá no final da primavera e a desova no início do verão, com um pico em dezembro.

No presente trabalho a média de massa corpórea foi de $1741,15 \pm 79,04$ e o comprimento médio foi $46,30 \pm 0,75$. O valor médio para comprimento está entre o valor encontrado para a primeira maturação por Marino no Mediterrâneo (43,8 cm) e o valor encontrado por Andrade na costa de Santa Catarina (47 cm). Considerando-se esses valores e as características morfológicas e histológicas das gônadas das fêmeas que não passaram pelo processo de inversão sugerimos que os animais utilizados eram adultos ou jovens próximos da primeira maturação sexual.

Não foi possível identificar alterações macroscópicas nas gônadas que indicassem a inversão sexual dos animais ao final dos nossos experimentos. No entanto, ao final dos experimentos um e três quando levamos em consideração os dados obtidos para o IGS evidenciamos a perda significativa de massa gonadal nos animais do grupo experimental que passaram pelo processo de inversão. Essa redução pareceu ser importante para a sinalização da reestruturação das gônadas femininas para gônadas masculinas que apresentam menor massa, haja vista que no experimento dois quando os animais não completaram o processo de inversão não observamos a mesma diferença significativa entre o grupo controle e experimental.

Segundo Vazzoler, (1996) o aumento da massa ovariana pode ser confirmado pelo IGS que expressa a porcentagem da massa das gônadas em relação a massa total dos indivíduos. Esse índice geralmente é utilizado para avaliar o grau de amadurecimento dos ovócitos ao longo do ciclo reprodutivo devido a deposição de vitelo e aumento da massa. O IGS também parece ser uma boa ferramenta para indicar o processo de inversão sexual evidenciando

perda de massa gonadal nos animais que invertem as gônadas femininas em gônadas masculinas, que normalmente apresentam menor massa.

De maneira geral em ambientes naturais as fêmeas adultas de peixes teleósteos podem apresentar quatro estágios de maturação gonadal ao longo do ciclo sexual: o estágio de crescimento primário ou pré-vitelogênico, o crescimento secundário ou vitelogênico, maturação final e regressão ou regredido (Grier et al., 2007; Lubzens et al., 2010; Honji, 2011).

Com base nas características morfológicas e histológicas, as gônadas das fêmeas de *E. marginatus* que não sofreram inversão se encontravam em crescimento primário ou pré-vitelogênico apresentando ovogônias em ninhos, células pequenas com citoplasma escasso e claro que apresentam um núcleo arredondado basofílico; com um único nucléolo em sua posição central. Ovócitos perinucleolares que exibem um ligeiro aumento de volume, uma célula maior. Observa-se a presença de vários nucléolos na periferia do núcleo e uma camada folicular fina envolvendo o ovócito. Alvéolos corticais em um processo inicial de vitelogênese lipídica, característico na transição da fase pré-vitelogênica para a vitelogênica. Esses ovócitos exibem uma vacuolização típica na periferia do citoplasma perto da membrana celular, vesículas que aumentam progressivamente com o desenvolvimento do ovócito podendo ocupar quase todo o citoplasma em momentos mais avançados. Este processo pode ser denominado de vitelogênese endógena e é caracterizado por vitelogênese lipídica, que representa a transição entre a presença de vesículas lipídicas e da deposição de grânulos de proteína (vitelogênese exógena, não observada no presente trabalho). As vesículas lipídicas aparecem no citoplasma das células como esferas vazias, devido ao uso de etanol no processamento histológico e conseqüentemente à falta de coloração pela hematoxilina-eosina. O citoplasma torna-se acidófilo e as células foliculares ficam mais evidentes.

Com esses dados constatamos que as fêmeas utilizadas nesse trabalho não deram prosseguimento ao processo de vitelogênese em condições assistidas ou em cativeiro. Mesmo no experimento dois que ocorreu durante o verão (época de desova), os animais não apresentaram ovócitos em estágio

vitelogênico avançado, maduro, e por fim, os folículos pós-ovulatórios, e/ou características de ovários em regressão ou regeneração descritos na literatura. Segundo Mylonas et al., (2010) a transferência de animais coletados na natureza e colocados em condições de cativeiro pode ser acompanhada de disfunções reprodutivas. Embora esses animais possam completar a vitelogênese, pode haver falha na maturação final, ovulação e desova (Zohar e Mylonas, 2001).

O processo de inversão sexual sequencial é caracterizado pelo decréscimo da atividade gametogênica do primeiro sexo e aumento da atividade do tecido germinativo do segundo sexo (Johnson et al., 1998). No caso das espécies hermafroditas, a inversão de sexo ocorre naturalmente em alguns grupos de vertebrados, dentre os Perciformes e em várias famílias inclusive nos serranídeos (Shapiro, 1987), mas o ambiente de cativeiro também pode influenciar no controle fisiológico do eixo reprodutivo, alterando o processo natural de inversão do sexo, que em geral ocorre espontaneamente nas espécies e é controlada por fatores genéticos, fisiológicos e comportamentais (Lone et al., 2001).

A atividade da aromatase das gônadas e do cérebro e os níveis séricos de esteroides sexuais (estradiol-17 β , E₂; testosterona, T; 11-cetotestosterona, 11KT) em machos, fêmeas e animais em processo de inversão natural da garoupa *Epinephelus akaara* foram investigados durante o ciclo reprodutivo anual na base de aquicultura de *Guangdong Daya Bay Fishery*, (Huizhou, Guangdong, PR China) em condições naturais. Na época de reprodução, as fêmeas de *E. akaara* apresentaram níveis mais altos de E₂ do que os machos e os animais em processo de inversão, enquanto os machos e os animais em processo de inversão apresentaram maiores níveis de 11KT e, em menor grau, maiores níveis de T do que as fêmeas. Nas fêmeas a atividade da aromatase do cérebro e das gônadas demonstrou alterações significativamente sazonais (exibindo um pico na estação de reprodução). Além disso, foi observada uma atividade da aromatase significativamente menor nos testículos na época reprodutiva. Em conjunto, os dados obtidos indicaram que as mudanças nos níveis séricos de

esteroides sexuais e a atividade da aromatase estavam intimamente associadas com a inversão sexual nesta espécie (Li et al., 2007).

As análises das gônadas dos experimentos um e três, iniciados na primavera (início da estação reprodutiva), mostraram que apesar de ainda manter a estrutura lamelar descrita nos ovários, as gônadas dos animais experimentais que receberam doses de inibidor de aromatase (letrozole), apresentavam uma estrutura característica do sexo masculino com cistos de células germinativas masculinas em diferentes estágios de desenvolvimento inclusive espermatozoides, e liberação de sêmen após sessenta, e setenta e sete dias após o início do tratamento, respectivamente.

A estrutura lamelar persistente nas gônadas é característica de espécies hermafroditas protogínicas monândricas. Nos machos secundários em espécies monândricas os testículos preservam características de sua fase anterior do sexo feminino, ou seja, um ovário com a estrutura lamelar, lúmen e, ao mesmo tempo cistos espermáticos recém-formados no interior do lúmen ovariano após a inversão sexual (Mitcheson e Liu 2008).

Os hermafroditas protogínicos *Brachydanio rerio*, *Macropodus opercularis* (Chan e Yeung, 1983), *Epinephelus microdon* (Bruslé et al., 1989) e *Thalassoma duperrey* (Nakamura et al., 1989) apresentaram a proliferação de tecido intersticial (estroma), e a degeneração de ovócitos em crescimento primário como os primeiros sinais citológicos da inversão sexual, antes da proliferação de espermatogônias e formação dos lóbulos testiculares (Tan-Fermin et al., 1994).

No experimento dois, iniciado no verão, já na fase final da estação reprodutiva e época de desova, os animais do grupo experimental não apresentaram um resultado satisfatório na inversão sexual. As gônadas desses animais apresentaram uma desorganização, um aumento do tecido intersticial e ovócitos em crescimento primário em fase de degeneração, mas não apresentaram a liberação de sêmen.

As espécies protogínicas da família Serranidae são consideradas modelos excelentes para o entendimento do processo de inversão sexual, pois antes da formação dos testículos apresentam um desenvolvimento gonadal que passa por um estágio de transição observando-se a presença de

células germinativas primordiais e diferentes estágios de células sexuais durante a ovogênese e espermatogênese na estrutura das gônadas de animais em transição (Bhandari et al., 2003; Rodrigues-Filho, 2010; Zhou e Gui, 2010).

A duração total do processo de espermatogênese é determinada pelo genoma das células germinativas (França et al., 1998). Esse tempo de desenvolvimento é bem definido em mamíferos e talvez em outros vertebrados endotérmicos como, por exemplo, ratos e camundongos onde o processo para espermatogônias se desenvolverem em espermatozoides ocorre em aproximadamente 59 e 39 dias, respectivamente (Russell et al., 1990).

Em animais vertebrados ectotérmicos, a temperatura é um fator adicional na definição do tempo de duração do processo de espermatogênese (Schulz e Miura, 2002). Em um estudo envolvendo o tempo de espermatogênese em *zebrafish* (*Danio rerio*) a duração combinada das fases meióticas e da espermiogênese foi de aproximadamente 6 dias, um dos períodos mais curtos entre o peixes teleósteos (Leal et al., 2009).

No processo de espermatogênese as células germinativas passam por três fases principais: mitose com proliferação (espermatogônias), a meiose (espermatócitos), e espermiogênese, ou seja, a transformação das espermátides haploides em espermatozoides flagelados. O processo é alimentado pela atividade proliferativa de células-tronco espermatogônias, que fornecem um de dois tipos de células: células-tronco (auto-renovação, via necessária para a fertilidade prolongada) ou espermatogônias que estão comprometidas com a proliferação mitótica, levando à meiose e à espermiogênese (Schulz e Miura, 2002; Schulz et al., 2010).

Para promover a inversão sexual em animais jovens de *E. marginatus*, Rodrigues-Filho (2010) formou 3 grupos experimentais e um grupo controle acompanhados ao longo de 90 dias experimentais. Na musculatura dorsal aplicou-se 100 mg/Kg de IA (letrozole), 15 mg/Kg de MT e um tratamento misto (AI + MT), com doses de 100 mg/Kg de AI e 7,5 mg/Kg de MT nos grupos experimentais. No grupo controle foi aplicado somente óleo de peixe utilizado como veículo. Nesse trabalho foi encontrado um grau mais avançado de espermatogênese nos animais implantados com MT, no entanto

os animais não chegaram a produzir uma grande quantidade de espermatozoides. Nesses animais classificados como intersexo foram observados diversos eventos simultâneos: aparente desorganização da arquitetura gonadal; massiva degeneração das células germinativas femininas; presença de centros melanomacrofágicos; proliferação de estruturas associadas ao sexo masculino (tecido intersticial e células germinativas masculinas); e a maturação das células germinativas masculinas.

As análises do primeiro experimento mostram que apesar da espermatogênese e liberação do sêmen de um único indivíduo ocorrer com 35 dias após o tratamento, as análises histomorfológicas das gônadas nos permitem sugerir que o período requerido para a total reestruturação gonadal, ou seja, para que a arquitetura ovariana se altere totalmente para a arquitetura testicular, é maior. No entanto, este período experimental já foi suficiente para promover alterações na produção de esteroides gonadais, possivelmente devido à atividade das células de Leydig testiculares, que proporcionaram os picos de produção 11KT e de testosterona após 30 dias. A testosterona continuou elevada e concomitante a uma elevação significativa de 17-alfaOHprogesterona plasmática pode ter exercido influência direta na liberação de sêmen, decorrido após sessenta dias de experimento.

Considerando as espécies de serranídeos, um dos objetivos do trabalho de Alam et al., (2006a) foi investigar a possibilidade de promover a inversão sexual com a aplicação de inibidores de aromatase (fadrozole) na espécie *E. merra* em pleno período reprodutivo, no período de 23 dias entre duas fases de lua cheia. Nesse trabalho os autores obtiveram sucesso parcial, somente 60% dos animais inverteram. Como nessa época de reprodução a inversão ocorreu de forma mais rápida para alguns animais e não ocorreu em outros, os autores sugeriram uma dose de inibidor maior, e que o processo de inversão é dependente da estação na qual a esteroidogênese seja mais ativa. Alam et al., (2006a) utilizaram 1µg/100g de fadrozole em animais de massa de aproximadamente 100 g, uma dose proporcionalmente 10 vezes menor que a utilizada em nosso trabalho.

Esses dados encontrados para a espécie congênica a *E. marginatus* ajudaram a entender e explicar em parte do ocorrido com o experimento dois realizado em pleno verão, período avançado do ciclo reprodutivo (desova); quando não ocorreu a inversão sexual, mesmo com o grupo experimental apresentando um aumento significativo da testosterona plasmática após 30 dias e um aumento significativo de 17-alfaOHprogesterona após 60 dias em relação ao grupo controle do experimento. A manutenção na concentração de 11KT ao longo de todo o experimento e a elevação na concentração do estradiol plasmático tanto no grupo controle como no experimental constituem outros fatores a considerarmos nesse experimento que ao final de 60 dias apresentaram animais debilitados que não se alimentavam de forma regular e com um comportamento atípico nos tanques, permanecendo na superfície por longos períodos. Essas observações levaram a suspeitar que os animais não sobreviveriam a outra dose de inibidor de aromatase. A alta temperatura da água com picos de 29° C ao longo do experimento foi outro fator que pode ter contribuído para a debilidade dos animais e a não inversão após o tratamento.

O aumento dos níveis plasmáticos de 11KT nos animais que inverteram o sexo após o tratamento com IA e o aumento na produção de 11KT em fragmentos ovarianos (*in vitro*) com o mesmo tratamento (IA) (Bhandari et al., 2004b) sugeriram que o andrógeno 11KT desempenha um papel importante na inversão sexual em *E. merra*. Além disso, 11KT tem sido utilizado para promover a inversão sexual dos peixes hermafroditas (Bhandari et al., 2004b).

Os dados para a inversão sexual em estágios mais avançados do ciclo reprodutivo obtidos por Alam et al., (2006a) aliados aos resultados de nosso experimento dois, conduzido também em estágios mais avançados do ciclo reprodutivo (desova), nos levou a considerar a hipótese que o tratamento para se obter a inversão sexual pode ser menos efetivo e mais irregular em estágios mais avançados do período reprodutivo.

Afonso et al., (1999) investigando os efeitos do inibidor de aromatase fadrozole sobre a concentração dos esteroides sexuais plasmático e a taxa de ovulação em fêmeas de *Coho salmon*, *Oncorhynchus kisutch*, perto de

maturação final, concluíram que este inibidor de aromatase é eficaz na redução da concentração de estradiol plasmático nestes animais. Além disso, o estudo demonstrou que pode haver um aumento associado na concentração de $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one indicando uma mudança na biossíntese de estradiol e na biossíntese de $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, característico nos estágios avançados de maturação dos peixes teleósteos.

Com a aplicação de doses proporcionais de inibidor de aromatase à que foi aplicada no presente experimento Bhandari et al., (2004a) induziram a mudança de sexo em *E. merra* no prazo de 90 dias quando o experimento foi conduzido fora da temporada de reprodução e após 75 dias, quando o tratamento se iniciou em um período próximo do início da estação reprodutiva (Bhandari et al., 2004b). Os resultados destes experimentos, assim como aqueles obtidos por Alam et al., (2006a) indicaram que a duração do tratamento com inibidor de aromatase em *E. merra* diminui com a proximidade da estação reprodutiva. Esta é uma observação importante e evidencia que o tempo necessário para que ocorra uma inversão sexual completa também depende da fase de desenvolvimento do peixe ao longo da estação de reprodução, provavelmente devido ao aumento da esteroidogênese na época de reprodução. Além disso, Bhandari et al (2004a) demonstraram que a inversão depende da dose de inibidor de aromatase (IA) aplicada. Nesse trabalho os dados obtidos constataram que uma dose de $1000\mu\text{g/kg}$ aplicados por um único implante de manteiga de cacau diminui significativamente o E_2 , aumenta a 11KT e não altera a concentração de testosterona promovendo a inversão total ou até estágios avançados de inversão com a visualização de espermatozoides, como eles próprios classificaram.

Analisando os dados dos experimentos 1 e 3 quando aplicamos doses de IA de $100\mu\text{g/kg}$ a cada trinta dias experimentais, foram necessários 3 doses e 77 dias para observarmos a espermição no experimento 3 que se iniciou logo no início da estação reprodutiva concomitantemente ao início da primavera. Já no primeiro experimento quando iniciamos um pouco mais tarde no meio da primavera, na estação reprodutiva um pouco mais

adiantada, a espermiação foi verificada após 60 dias após a aplicação de duas doses de inibidor de aromatase.

Considerando somente os dados de tempo de duração do processo de inversão sexual e dose aplicada, também podemos considerar que a inversão sexual depende da fase de desenvolvimento do animal ao longo da estação de reprodução. Entretanto é preciso levar em consideração que os animais utilizados nos experimentos um e três apresentavam características de fêmeas em estágio pré-vitelogênico, e nenhum dos grupos de animais seria classificado em um estágio mais adiantado de desenvolvimento mesmo com o experimento um se iniciando um pouco mais tarde na primavera. Além do mais, tivemos um pequeno problema de hidratação do IA no experimento três, o que nos remeteu a dúvidas quanto à necessidade efetiva da terceira dose ser devido a época do início do experimento ou a pouca eficiência do IA. Quando consideramos a forma de aplicação do IA, podemos evidenciar que a metodologia que envolve a aplicação de doses menores em um intervalo de tempo de trinta dias promoveu a espermiação e consequente inversão em um período de tempo menor quando comparado aos períodos encontrados por Bhandari et al. (2004a, b) aplicando doses proporcionais.

Com a análise do perfil hormonal obtidos nos experimentos um e três podemos sugerir que a elevação dos níveis plasmáticos de 11KT e testosterona exerceram um papel fundamental na inversão sexual de *E. marginatus* obtida nesse trabalho. O papel fundamental exercido pela testosterona e 11KT na inversão sexual também fica evidente quando observamos o perfil desses hormônios ao longo do terceiro experimento, quando ocorreu um pico de 11KT após trinta dias e um aumento significativo de testosterona e de 17-alfaOHprogesterona plasmática após setenta e sete dias do início do experimento quando se constatou a liberação de sêmen nos animais que receberam o inibidor de aromatase. Padrão semelhante ao encontrado no primeiro experimento. Nesse sentido podemos concluir que a administração de letrozole promoveu a inversão sexual e a liberação de sêmen nos indivíduos invertidos. O aumento nas concentrações de testosterona e de 11KT obtidos no presente trabalho também foram

detectados nos trabalhos de Bhandari et al., (2004 a, b) em trabalhos com *E. merra*.

Bhandari et al., (2004a) obtiveram um bom resultado de inversão e uma elevação significativa na concentração de 11KT e uma diminuição significativa na concentração de E₂ utilizando um implante de 1000. µg de IA. Nesse mesmo trabalho quando aplicou implante de 500 µg, dos 8 animais que formavam o grupo experimental 2 permaneceram fêmeas, 5 foram classificados em estágio inicial de inversão e 2 animais em estágio avançado de inversão. Com esse implante constatou-se uma queda significativa na concentração plasmática de estradiol e não ocorreu aumento significativo na concentração de 11KT.

Considerando-se os dados encontrados por Bhandari et al., (2004a) acrescido do fato de que não foi encontrada queda na concentração de estradiol plasmático nos animais invertidos nos experimentos um e três sugerimos que o aumento dos andrógenos, principalmente de 11KT pode ser o gatilho da inversão sexual. Em nossos experimentos foram aplicados uma dose total de 200 µg/ kg de peixe no experimento um e uma dose total de 300 µg/ kg no terceiro experimento, abaixo daquela aplicada por Bhandari et al., (2004a) para evidenciar a queda no estradiol plasmático. O método de aplicação e a dose de IA efetivadas no presente trabalho foram suficientes para promover uma elevação na concentração de 11KT e a inversão sexual, mas ineficiente para promover a queda na concentração do estradiol plasmático.

Os hormônios esteroides parecem exercer um papel fundamental na reestruturação gonadal e formação do tecido masculino no processo de inversão sexual nas espécies protogínicas (Devlin e Nagahama, 2002; Frisch 2004). O aumento na produção *in vitro* e o elevado nível de 11KT plasmático observado no trabalho de Bhandari et al., (2004b) na inversão sexual de *E. merra* com a administração de inibidor de aromatase sugere um papel importante desse hormônio no processo de inversão sexual nessa espécie. As células da túnica são os principais locais de síntese de 11KT no ovário de *E. merra* e níveis elevados desse hormônio podem causar degeneração dos ovócitos e iniciar a inversão sexual (Alam et al., 2006b). Outros estudos

enfocando a inversão sexual em hermafroditas protogínicos sugerem que a 11KT exerce um papel importante no processo (Kroon e Liley, 2000;. Yeh et al., 2003; Kobayashi et al., 2010). Bhandari et al., (2006) aplicaram 11KT em fêmeas de *E. merra* e após 75 dias do tratamento observaram a completa inversão sexual com acúmulo de espermatozoides no ducto espermático, uma diminuição na concentração de E₂ plasmático e aumento nas concentrações de testosterona e 11KT.

Além dos esteroides gonadais, a hipófise também atua na regulação do processo de espermatogênese pela ação dos hormônios gonadotrópicos, LH e FSH. Uma função importante do LH é estimular a produção de andrógenos nas células de Leydig pela ativação do receptor LH (LH-R). O FSH desempenha um importante papel regulador durante as fases iniciais da espermatogênese, enquanto o LH está principalmente envolvido na fase final de maturação dos espermatozoides. O processo que regula o mecanismo de renovação das espermatogônias em peixes parece ser dependente da manutenção dos teores de estradiol (Schulz et al., 2010).

Kobayashi et al., (2010) na tentativa de elucidar o papel exercido pelas gonadotropinas implantou FSH purificado de bovinos em uma dose de 500ng/peixe. Após três semanas do tratamento foi observada uma proliferação de espermatogônias caracterizando a inversão sexual inicial. Nesse momento observou-se um aumento na expressão de β FSH na hipófise e na concentração plasmática de 11KT; a concentração de E₂ permaneceu inalterada. Esses resultados de inversão sexual induzida por FSH aproximam-se dos resultados do presente trabalho, onde é observado um aumento de 11KT e mantida a concentração de estradiol plasmático.

No presente trabalho, nos animais administrados com IA e que completaram a inversão sexual, evidencia-se um padrão de comportamento dos esteroides gonadais, caracterizado pelo aumento da concentração de 11KT na fase inicial do processo, manutenção na concentração de E₂ e um aumento na concentração de testosterona e 17-alfaOHprogesterona no final do processo de inversão. Por outro lado, a expressão dos genes β FSH e β LH foi menor nos animais que sofreram inversão sexual, quando comparada aos animais do grupo controle, e ainda, a expressão do gene de β FSH está mais

baixa que a do gene de β LH, também ao final do experimento. Desta forma, especula-se que a concentração elevada dos esteroides gonadais pode estar modulando de alguma forma a diminuição da expressão de β FSH ao final da inversão. Neste cenário, principalmente as concentrações de andrógenos pode ter ativado a alça de *feedback* negativo e juntamente com a ativação do sistema da *kisspeptina* podem ter promovido a ação do GnRH desviando a produção de FSH para LH. Nesse momento o número de cópias de β FSH encontrados na hipófise é significativamente menor que o número encontrado no grupo controle. Ao observarmos o aumento significativo da concentração plasmática de 17-alfaOHprogesterona podemos sugerir que a ação do GnRH tenha aumentado a secreção do LH, principal gonadotropina que estimula a produção de progestágenos. Essa hipótese baseia-se no fato de que, quando são comparados o número de cópias de β FSH e β LH na hipófise dos animais do grupo experimental observamos um número de cópias significativamente maior para o β LH neste momento dando suporte para ressaltar a importância do aumento do LH nos estágios finais da inversão sexual para a viabilidade e motilidade dos espermatozoides (via ação dos progestágenos).

Os dados obtidos para o experimento dois também podem reforçar a suposição da importância do 11KT no processo de inversão, haja vista que não se obteve aumento significativo em sua concentração ao longo do experimento e consequentemente não houve alterações significativas na expressão do gene de β FSH nesse experimento.

Nos machos da maioria das espécies de teleósteos estudadas até o momento, sabe-se que a maturação dos espermatozoides é regulada pelos progestágenos, que modulam o aumento do pH no plasma seminal, aumentando o conteúdo de AMPc dos espermatozoides, o que confere o aumento da motilidade espermática (Miura e Miura, 2003).

Cabrita et al., (2009) obtiveram uma variação de 5 a 400 μ L para o volume de sêmen produzido e uma variação de 1,2 a 16,6 x 10⁹ células mL⁻¹ na densidade espermática aferidos antes da criopreservação no trabalho de criopreservação de sêmen obtidos na inversão sexual de *E. marginatus*. Sanches et al. (2009) em trabalho semelhante, também com *E. marginatus*

obtiveram um volume médio de sêmen de $360 \pm 26 \mu\text{L}$ e uma densidade espermática de $3,1 \times 10^9$ células mL^{-1} .

Embora o volume médio de sêmen ($101,0 \pm 45,88 \mu\text{L}$) obtido no experimento um tenha ficado na média dos dados encontrados na literatura, a densidade espermática ($222,5 \pm 147,5 \times 10^6$ células mL^{-1}) obtida para o experimento ficou muito abaixo da encontrada por outros autores para a espécie. Spedicato et al., (1995), obtiveram uma densidade espermática de 4,7 a $8,6 \times 10^9$ células mL^{-1} um pouco acima do encontrado por Sanches et al., (2009). Suspeita-se que nesse experimento provavelmente a densidade espermática assim como a baixa motilidade obtidos ocorreram devido a provável contaminação de urina no momento da coleta. Já no experimento três, na análise do sêmen, a motilidade observada foi de 90% e a densidade espermática encontrada foi de $8,94 \pm 4,34 \times 10^9$ células mL^{-1} e o volume médio de $118,20 \pm 24,83 \mu\text{L}$; bem semelhantes aos dados encontrados na literatura para esses parâmetros.

Ao longo do desenvolvimento dos trabalhos de inversão sexual, a concentração de proteínas totais plasmática, hepática e musculares foi analisada. No segundo experimento a concentração de proteínas musculares apresentou um valor significativamente maior nos animais do grupo experimental em relação ao grupo controle. Como neste experimento não ocorreu a inversão e espermição podemos especular que o aumento de testosterona observado no grupo experimental, após trinta dias, pode ter promovido uma deposição de proteínas musculares. Os andrógenos são conhecidos como hormônios anabólicos, pois promovem o aumento da produção hepática de IGF-I (Davis et al., 2007), levando a um aumento dos processos anabólicos nos tecidos periféricos, como a síntese proteica. No entanto, o efeito dos andrógenos no aumento de proteína no músculo esquelético de peixes pode ser dose-dependente ou dependem da fase do desenvolvimento (Cleveland e Weber, 2011). A síntese proteica no fígado é direcionada para a renovação de proteínas corporais, enquanto que no músculo, a síntese é direcionada principalmente para a deposição (Fauconneau, 1985).

De uma forma geral podemos concluir que o uso de inibidor de aromatase é um método eficaz para promover a inversão sexual em hermafroditas protogínicos como a garoupa verdadeira. Para elucidar os pontos de interrogação na atuação dos hormônios esteroides e alterações no controle do eixo hipotálamo- hipófise -gônada é necessário investigar melhor a dose aplicada e aumentar o número de coletas de dados ao longo do processo para podermos efetivamente comprovar o envolvimento do andrógeno 11KT e identificarmos o seu papel na modulação da expressão do gene para β FSH no início da inversão e o envolvimento do LH no processo final, de forma a relacionar a sua influência com a viabilidade e motilidade dos espermatozoides do sêmen produzido pelos animais que passaram pelo processo de inversão.

6. Considerações finais

O método aplicado para promover a inversão sexual de fêmeas adultas de *Epinephelus marginatus* utilizando-se o inibidor de aromatase (Letrozole) produziu resultados positivos uma vez que promoveu a inversão sexual. Quando consideramos a forma de aplicação das doses do IA, podemos afirmar que a aplicação parcelada das doses foi eficiente para promover a inversão sexual em *E. marginatus*. No entanto, o desenvolvimento de um *pellet* de difusão lenta e contínua deve ser estudado, considerando-se que no presente trabalho não foi avaliado o estresse causado pela manipulação dos animais e aplicação de doses parceladas a cada trinta dias.

A concentração de IA utilizada deve ter ficado aquém da quantidade necessária; pois foi ineficiente para promover a inversão quando o tratamento foi aplicado em Dezembro, no verão; período avançado de reprodução e provavelmente época de desova dos animais. Quando os experimentos foram conduzidos no início da primavera e no meio da mesma estação, a dose aplicada, embora tenha promovido a inversão sexual, não foi suficiente para promover uma diminuição significativa do estradiol plasmático observado e relatado na literatura ao longo do processo de inversão.

Os animais invertidos apresentaram uma desorganização gonadal peculiar comumente encontrada em espécies hermafroditas protogínicas monândricas, com lamelas características de ovário, no entanto em seu interior, o compartimento intersticial apresentou-se com células de Sertoli e cistos de células germinativas masculinas em estágios avançados da espermatogênese: espermatócitos, espermatídes, e espermatozoides no lúmen. O índice gonadossomático (IGS) também foi uma boa ferramenta para indicar o processo de inversão sexual evidenciando perda de massa gonadal nos animais que inverteram as gônadas femininas em gônadas masculinas, que apresentam uma massa gonadal menor.

As alterações obtidas nas concentrações dos hormônios esteroides, principalmente o aumento na concentração dos andrógenos, parecem

exercer um papel fundamental na reestruturação gonadal e formação do tecido masculino no processo de inversão sexual em *E. marginatus*. Os resultados sugeriram que nem sempre há uma queda nos níveis de estrogênio no processo de inversão sexual. O E₂ pode estar envolvido no início da espermatogênese na modulação do processo mitótico na proliferação das espermatogônias sendo talvez, um importante hormônio masculino.

Sugerimos que o aumento dos andrógenos pode ser o gatilho da inversão sexual. Há a necessidade de se investigar a possibilidade de relação entre o aumento encontrado para a concentração plasmática de 11KT e a alteração da expressão de β FSH, assim como a possível relação entre o aumento da concentração plasmática da testosterona e a predominância da expressão do β LH em relação ao β FSH ao final do processo nos animais invertidos que apresentaram sêmen.

Com os resultados obtidos nesse trabalho podemos sugerir que a primavera é a melhor época do ano para se realizar o procedimento de inversão sexual na região Sudeste do Brasil. Não ficou claro se um estágio de desenvolvimento com ovócitos em fases mais avançadas do desenvolvimento prejudicaria o processo de inversão. Os animais utilizados nos experimentos encontravam-se em estágio inicial ou pré-vitelogênico de desenvolvimento ovocitário, além do mais, o período de aclimação ao cativeiro pode ter interrompido o processo de vitelogênese. A dificuldade em obter um número satisfatório de animais com estágio de maturação avançada em ambiente natural foi muito grande e impediu a realização de um experimento envolvendo animais maiores e em um estágio mais avançado de desenvolvimento no ciclo reprodutivo.

A utilização do inibidor de aromatase (Letrozole) permitiu a produção de machos invertidos e sêmen de boa qualidade segundo as características analisadas. Recomenda-se o aperfeiçoamento deste método principalmente no tocante a concentração de letrozole com o objetivo de dominar completamente o processo de inversão e consequentemente a produção de

sêmen. Desse modo será possível promover a sincronização da produção de sêmen com o amadurecimento de ovócitos para se efetivar uma reprodução assistida e testar o sêmen produzido por machos invertidos de *E. marginatus*.

Os resultados do presente trabalho são importantes para um próximo passo no cultivo de *E. marginatus* que é a produção de sêmen para a criopreservação e formação de um banco de sêmen para a espécie como proposto em literatura.

7. Referências Bibliográficas

- Afonso, L.O.B.; Iwama, G.K.; Smith, J.; Donaldson, E.M. 1999. Effects of the aromatase inhibitor Fadrozole on plasma sex steroid secretion and oocyte maturation in female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during vitellogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry* 20:231–241.
- Afonso, L.O.B.; Wassermann, G.J.; Oliveira, T.R. 2001. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. *Journal of Experimental Zoology*, 290: 177-18.
- Alam, M.A.; Bhandari, R.K.; Kobayashi, Y.; Soyano, K.; Nakamura, M. 2006a. Induction of sex change within two full moons during breeding season and spawning in grouper. *Aquaculture*, 255: 532–535.
- Alam, M.A.; Bhandari, R.K.; Kobayashi, Y.; Soyano, K.; Nakamura, S.; Soyano, K.; Nakamura, M. 2006b. Changes in Androgen-Producing Cell Size and Circulating 11-Ketotestosterone Level during Female–Male Sex Change of Honeycomb Grouper *Epinephelus merra*. *Molecular Reproduction and Development*, 73: 206–214.
- Andrade, A.B.; Machado, L.F.; Hostim-Silva, M.; Barreiros, J.P. 2003. Reproductive Biology of the Dusky Grouper *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46: 373–381.
- Antoneli, F.N. 2006. Perfil morfo-funcional da inversão de sexo em Synbranchidae (Teleostei: Synbranchiformes). Campinas, Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. 164p.
- Aizen, J; Kasuto, H.; Levavi-Sivan, B. 2007. Development of specific enzyme-linked immunosorbent assay for determining LH and FSH levels in tilapia, using recombinant gonadotropins. *General and Comparative Endocrinology*, 153:323–332.

- Baldisserotto, B.; Gomes, L. C. 2005. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM, 470p.
- Baroiller, J.-F.; Guiguen, Y.; Fostier, A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation. CMLS- Cellular and Molecular Life Sciences, Vol. 55.
- Barreiros, J.P. 1998. Sexual inversion in *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces: Serranidae, Epinephelinae) nos Açores. Revista Portuguesa de Zootechnia, 5: 81-90.
- Behmer, O.A.; Tolosa, E.M.C.; Neto, A.G.F. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART. São Paulo. Livraria Editora Ltda. 239p.
- Bhandari, R.K.; Alam, M.A.; Soyano, K.; Nakamura, M. 2006. Induction of female-to-male sex change in honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by 11-ketotestosterone treatments. Zoological Science, 23, 65–69.
- Bhandari, R.K.; Komuro, H.; Mikiyoko, H.; Massaru, N. 2004(a). Sex inversion of sexually immature honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by aromatase inhibitor. Zoological Science, 21: 305-310.
- Bhandari, R.K.; Higa, M.; Nakamura, S.; Nakamura, M. 2004(b). Aromatase Inhibitor induces complete sex change in the protogynous honeycomb Grouper (*Epinephelus merra*). Molecular Reproduction and Development, 67: 303–307.
- Bhandari, R.K.; Komuro, H.; Nakamura, S.; Higa, M.; Nakamura, M. 2003. Gonadal restructuring and correlative steroid hormone profiles during natural sex change in protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). Zoological Science, 20: 1399–1404.
- Blázquez, M.E.; Somoza, G.M. 2010. Fish with thermolabile sex determination (TSD) as models to study brain sex differentiation. General and Comparative Endocrinology, 166: 470–477.

- Bombardelli, R.A.; Mörschbacher, E.F.; Campagnolo, R. 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). Revista Brasileira de Zootecnia, 35 (4):1251-1257.
- Bruslé, S.; Debas L.; Cauty, C. 1989. Morphological and cytological aspects of sex inversion in a protogynous hermaphrodite, *Epinephelus microdon* (Teleostei, Serranidae). Advances in Tropical Aquaculture. Tahiti, Aqua Cop Ifremer. Actes de Colloque, 9: 559-562.
- Bustin, S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25:169–193.
- Cabrita, E.; Engrola, S.; Conceição, L.E.C.; Pousão-Ferreira, P.; Dinis, M.T. 2009. Successful cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. Aquaculture, 287: 152-157.
- Castilho, T.M.; Camargo, L.M.A.; McMahon-Pratt, D.; Shaw, J.J.; Floeter-Winter, L.M. 2008. A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Identification and Quantification of American Leishmania Species on the Basis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 78: (1) 122–132.
- Chan, S.T.H.; Yeung, W.S.B. 1983. Sex control and sex reversal in fish under natural conditions. In W.S. Hoar, D. J. Randall and F. M. Donaldson (eds.). Fish Physiology IX B, reproduction, behavior and fertility control. New York: Academic Press, 171-222.
- Chan, S.T.H.; Yeung, W.S.B. 1989. Sex steroids in intersexual fishes. Fish Physiology and Biochemistry, 7: 229-235.
- Chao, T.M.; Chow, M. 1990. Effect of methyltestosterone on gonadal development of *Epinephelus tauvina* (Forsk.) (Forsk.). Singapore Journal of Primary Industries, 18: 1-14.

- Chao, T.M.; Lim, L.C. 1991. Recent developments in the breeding of grouper (*Epinephelus* sp.) in Singapore. Singapore Journal of Primary Industries, 19: 78-93.
- Cleveland, B.M.; Weber, G.M. 2011. Effects of sex steroids on indices of protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with muscle. General and Comparative Endocrinology, 174: 132-142.
- Coleman, F.C.; Koenig, C.C.; Huntsman, G.R.; Musick, J.A.; Eklund, A.M.; McGovern, J.C.; Chapman, R.W.; Sedberry, G.R.; Grimes, C.B. 2001. Long-lived reef fishes: the grouper-snapper complex. Fisheries, 25 (3): 14-20.
- Cornish, A.; Harmelin-Vivien, M. 2004. *Epinephelus marginatus*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Acessado em 03 de Fevereiro de 2012.
- Craig, M.T.; Hastings, P.A. 2007. A molecular phylogeny of the groupers of the subfamily Epinephelinae (Serranidae) with a revised classification of the Epinephelini. Ichthyological Research, 54: 1-17.
- Davis, L.K.; Hiramatsu, N.; Hiramatsu, K.; Reading, B.J.; Matsubara, T.; Hara, A.; Sullivan, C.V.; Pierce, A.L.; Hirano, T.; Grau, E.G. 2007. Induction of Three Vitellogenins by 17beta-Estradiol with Concurrent Inhibition of the Growth Hormone-Insulin-Like Growth Factor 1 Axis in a Euryhaline Teleost, the Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Biology of Reproduction, 77: 614-625.
- Devlin, R.H.; Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 208: 191-364.
- Evans, D.H.; Claiborne, J.B. 2006. The Physiology of Fishes. 3rd edition, CRC Press: Boca Raton.
- Fauconneau, B. 1985. Protein synthesis and protein deposition in fish In: Cowey, C.B.; Mackie, A.M.; Bell, J.G. Nutrition and Feeding in fish. New York: Academic Press, p.17-47.

- Fostier, A.; Jalabert, B.; Billard, R.; Breton, B.; Zohar, Y. 1983. The gonadal steroids. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and E.M. Donaldson (eds.) *Fish Physiology*. New York: Academic Press, 9: 277-372.
- França, L. R.; Ogawa, T.; Avarbock, M.R.; Brinster, R.L.; Russell, L.D. 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 59: 1371-7.
- Frish, A. 2004. Sex change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 14: 481-499.
- Grier, H.J.; Uribe, M.C.; Parenti, L.R. 2007. Germinal epithelium, folliculogenesis and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). *Journal of Morphology*, 268: 293-310.
- Guiguen, Y.; Fostier, A.; Piferrer, F.; Chang, C. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 352-366.
- Hayes, T.B. 1998. Sex Determination and Primary Sex Differentiation in Amphibians: Genetic and Developmental Mechanisms. *The Journal of Experimental Zoology*, 281: 373-399.
- Heemstra, P.C.; Randall, J.E. 1993. FAO species catalogue. Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). FAO, Rome, 16: 382.
- Honji, R.M. 2011. Controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas do surubim do Paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) em relação ao ciclo reprodutivo e à reprodução induzida em cativeiro. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Johnson, A.K.; Thomas, P.; Wilson, R.R. 1998. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. *Journal of Fish Biology*, 52: 502-518.

- Kitano, T.; Takamune, K.; Nagahama, Y.; Abe, S.I. 2000. Aromatase inhibitor and 17alpha-methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Reproduction and Development*, 56: 1-5.
- Kobayashi, Y.; Alam, M.A.; Horiguchi, R.; Shimizu, A.; Nakamura, M. 2010. Sexually dimorphic expression of gonadotropin subunits in the pituitary of protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*): Evidence that follicle-stimulating hormone (FSH) induces gonadal sex change. *Biology of Reproduction*, 82: 1030–1036.
- Kroon, F.J.; Liley, N.R. 2000. The role of steroid hormones in protogynous sex change in the blackeye goby, *Coryphopterus nicholsii*. *General and Comparative Endocrinology*, 118: 273–283.
- Kuo, C.M.; Ting, Y.Y.; Yeh, S.L. 1988. Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper, *Epinephelus fario*. *Aquaculture*, 74: 113-126.
- Leal, M.C.; Cardoso, E.R.; Nóbrega R.H.; Batlouni, S.R.; Bogerd, J.; França, L.R.; Schulz, R.W. 2009. Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an emphasis on Spermatogonial Generations. *Biology of Reproduction*, 81: 177–187.
- Levavi-Sivan, B.; Bogerd, J.; Mañanós, E.L.; Gómez, A.; Lareyre, J.J. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 412-437.
- Li, G.L.; Liu, X.C.; Lin, H.R. 2007. Seasonal changes of serum sex steroids concentration and aromatase activity of gonad and brain in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Animal Reproduction Science*, 99: 156–166.
- Lone, K.P.; Al-Ablane, S.; Al-Yaqout, A. 2001. Steroid hormone profiles and correlative gonadal histological changes during natural sex reversal of sobaity kept in tanks and sea-cages. *Journal of Fish Biology*, 58, 305–324.

- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Lubzens, E.; Young, G.; Bobe, J.; Cerdà, J. 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 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). *European Journal of Histochemistry*, 46: 87-100.
- Marino, G.; Azzurro, E.; Finoia, M.G.; Messina, M.T.; Massari, A.; Mandich, A. 2001. Reproduction in the dusky grouper from the southern Mediterranean. *Journal of Fish Biology*, 58: 909–927.
- Menezes, N.A.; Buckup, P.A.; Figueiredo, J.L.; Moura, R.L. 2003. Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Mitcheson, Y.S.; Liu, M. 2008. Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish and Fisheries*, 9: 1-43.
- Miura, T.; Miura, C.I. 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28: 181–186.
- Mylonas, C.C.; Fostier, A.; Zanuy, S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 516-534.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Development Biology*, 38: 217-229.
- Nakamura, M.; Hourigan, T.F.; Yamauchi, K.; Nagahama, Y.; Grau, E.G. 1989. Histological and ultrastructural evidence for the role of gonadal steroid hormones in sex change in the protogynous wrasse *Thalassoma duperrey*. *Environmental Biology of Fishes*, 24: 117-136.

- Nóbrega, R.H. 2006. Alterações do epitélio germinativo masculino, células endócrinas testiculares e células gonadotrópicas durante o ciclo reprodutivo de *Serrasalmus spilopleura* (Kner, 1859) e *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 185p.
- Nóbrega, R.H.; Batlouni, S.R.; França, L.R., 2009. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 197–206,
- Norris, D.O.; Lopez, K.H. 2011. Hormones and reproduction of vertebrates. *Fishes*, v. 1, p.270.
- Novais, C.M.; Pires-Alves, M.; Silva, F.F. 2004. PCR em tempo real. Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimeras. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 33: 10-13.
- Olsvik, P. A.; Lie, K. K.; Jordal, A. E. O.; Nilsen, T. O.; Hordvik, I. 2005. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*, 6: 21.
- Parhar, I.S.; Soga, T.; Ogawa, S.; Sakuma, Y. 2003. FSH and LH- β subunits in the preoptic nucleus: ontogenic expression in teleost. *General and Comparative Endocrinology*, 132: 369–378.
- Payne, A.H.; Hales, D.B. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews*, 25 (6):947-70.
- Pfaffl, M.W.; Hageleit, M. 2001. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letter*, 23: 275–282.
- Price, D.J. 1984. Genetic of sex determination in fishes – a brief review. In: *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*. I. G. H. Potts and R. J. Wootton (eds.). London: Academic Press, 77-89.

- Randall, D.; Burggren, W.; French, K., 2000. ECKERT Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações. Guanabara Koogan. 4º edição. Rio de Janeiro. RJ.
- Reinboth, R. 1998. Modes of reproduction in fishes. In: E. Knobil and J. D. Neill (eds.) Encyclopedia of Reproduction. London: Academic Press, 2: 365-372.
- Reinboth, R. 1988. Physiological problems of teleost ambisexuality. Environmental Biology of Fishes, 22: 249-259.
- Rodrigues-Filho, J.A.; Sanches, E.G.; Garcia, C.E.O.; Pannuti, C.V.; Sebastiani, E.F.; Moreira, R.G. 2009. Threatened fishes of the world: *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Serranidae: Epinephelinae). Environmental Biology of Fishes, 85: 301-302.
- Rodrigues-Filho, J.A. 2010. Alterações morfológicas e hormonais das gônadas e hipófise da garoupa *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae) durante a inversão sexual. 134 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.
- Russel, L.D.; Ettlin, R.A.; Sinha-Hikim, A.P.; Clegg, E.D. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press (Clearwater, Florida, U.S.A.), 1–37.
- Sadovy, Y.; Shapiro, D.Y. 1987. Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. Copeia, 1: 136-156.
- Sambrook, J.; David, W.R. 2001. A laboratory manual. Third Edition by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Vols: 1, 2 e 3.
- Sanches, E.G.; Oliveira, I.R.; Serralheiro, P.C.S. 2009. Inversão sexual da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, 10: 198-209.
- São Paulo. Decreto Estadual no 53494-2008 de 02 de outubro de 2008. Diário Oficial do Estado de São Paulo 118(187). Secretaria do Meio Ambiente.

- Sarter, K.; Papadaki, M.; Zanuy, S.; Mylonas, C. 2006. Permanent sex inversion in 1-year -old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17 α -methyltestosterone implants. *Aquaculture*, 256: 443-456.
- Schulz, R.W.; França, L.R.; Lareyre, J.J.; Legac, F.; Chiarini-Garcia, H.; Nobrega, R.H.; Miura, T. 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 390-411.
- Schulz, R.W.; Miura, T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 43-56.
- Shapiro, D.Y. 1987. Differentiation and Evolution of Sex Change in Fishes. *BioScience*, Vol. 37, No. 7, Organisms That Change Sex. 490-497.
- Spedicato, M.T.; Lembo, G.; Di-Marco, P.; Marino, G. 1995. Preliminary results in the breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Ciheam. Options Méditerranéennes*, 16: 131-148.
- Streit Junior, D.P.; Moraes, G.V.; Ribeiro, R.P.R. 2003. Estudo comparativo da indução hormonal da espermição em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 25(2): 261-266,
- Swillens, S.; Dessars, B.; Housni, H.E. 2008. Revisiting the sigmoidal curve fitting applied to quantitative real-time PCR data. *Analytical Biochemistry*, 373: 370-376.
- Tan-Fermin, J.D.; Garcia, B.L.M.; Castilho-Junior, R. 1994. Induction of sex inversion on juvenile grouper *Epinephelus suillus* (Valenciennes) by injections of 17 α methyltestosterone. *Japanese Journal of Ichthyology*, 29: 33-39.
- Vazzoler, A.E.A.M. 1996. *Biologia da Reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá, EDUEM. 169p..

- Warner, R.R. 1988. Sex change and the size-advantage model. *Trends in Ecology & Evolution*, 3:133-136.
- Wong, M.L.; Medrano, J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantification. *BioTechniques*, 39: 75–85.
- Yeh, S.L.; Dai, Q.C.; Chu, Y.T.; Kuo, C.M.; Ting, Y.Y.; Chang, C.F. 2003. Induced sex change, spawning and larviculture of potato grouper, *Epinephelus tukula*. *Aquaculture*, 228: 371- 381.
- Young, G.; Kusakabe, M.; Nakamura, I. 2005. Gonadal steroidogenesis in Teleost Fish. In: *Hormones and their Receptors in Fish Reproduction*, Melamed & Sherwood, World Scientific, v.4, 155.
- Zabala, M.; Louisy, P.; Garcia-Rubies, A.; Garcia, V. 1997. Social-behavioral context of reproduction in the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowee, 1834), (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW, Mediterranean, Spain). *Scientia Marina* 61(1): 79- 89.
- Zhou L.; Gui, J. F. 2010. Molecular mechanisms underlying sex change in hermaphroditic groupers. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36:181–193.
- Zohar, Y.; Mylonas, C.C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in culture of fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99-136.
- Zohar, Y.; Muñoz-Cueto, J.A.; Elizur, A.; Kah, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 438-455.

8. Tabelas

Tabela 1- Experimento 1. Valores médios dos índices hepatossomático e gonadossomático dos grupos controle e experimental (IA) de *Epinephelus marginatus* (média $\pm$ EPM); (n) número de animais. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($P = 0,004$).

Índice Hepatossomático (%)		Índice Gonadossomático (%)	
Controle	Experimental (IA)	Controle	Experimental (IA)
1,17 $\pm 0,16$ (5)	1,06 $\pm 0,17$ (5)	0,08 $\pm 0,008$ (5)(a)	0,04 $\pm 0,002$ (5) (b)

Tabela 2- Experimento 1. Comprimento total (cm), massa corpórea total (g), volume de sêmen (μL), densidade espermática determinada em câmara de Neubauer (células mL^{-1}) e motilidade (%) dos espermatozoides de *Epinephelus marginatus* após inversão sexual. (média $\pm$ EPM).

Características morfométricas		Características seminais		
Comprimento total (cm)	Massa corpórea (g)	Volume (μL)	Densidade x 10^6 células mL^{-1}	Motilidade (%)
49,10 $\pm 1,83$	1911,00 $\pm 268,27$	101,0 $\pm 45,88$	222,5 $\pm 147,5$	50

Tabela 3- Experimento 2. Valores médios dos índices hepatossomático e gonadossomático dos grupos controle e experimental (IA) de *Epinephelus marginatus* (média $\pm$ EPM); (n) número de animais.

Índice Hepatossomático (%)		Índice Gonadossomático (%)	
Controle	Experimental (AI)	Controle	Experimental (AI)
0,72 $\pm$ 0,08 (5)	0,63 $\pm$ 0,16 (5)	0,03 $\pm$ 0,005 (5)	0,02 $\pm$ 0,003 (5)

Tabela 4- Experimento 3. Valor médio do índice gonadossomático (%) dos grupos controle e experimental (IA) de *Epinephelus marginatus* obtido na inversão sexual. (média $\pm$ EPM); (n) número de animais. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($P=0,042$).

Índice Hepatossomático (%)		Índice Gonadossomático (%)	
Controle	Experimental (AI)	Controle	Experimental (AI)
1,39	1,65	0,17	0,11
$\pm 0,18$ (5)	$\pm 0,19$ (5)	$\pm 0,02$ (5)	$\pm 0,02$ (5)
		(a)	(b)

Tabela 5. Experimento 3. Comprimento total (cm), massa corpórea total (g), volume de sêmen (μL), densidade espermática determinada em câmara de neubauer (células mL^{-1}) e motilidade (%) dos espermatozoides de *Epinephelus marginatus* após inversão sexual (média $\pm$ EPM).

Características morfométricas			Características seminais	
Comprimento total (cm)	Massa Corpórea (g)	Volume (μL)	Densidade $\times 10^9$ células mL^{-1}	Motilidade (%)
39,34	1578,16	118,20	8,94	90
$\pm 5,31$	$\pm 205,16$	$\pm 24,83$	$\pm 4,34$	

9. Figuras

Figura 1. Representação esquemática da produção dos esteroides sexuais nas gônadas femininas. Interação das camadas foliculares teca e granulosa na produção de 17β-estradiol (E2) na fase de vitelogênese e de 17,20β-dihidroxy-4- pregnen-3-one na fase de maturação. (Retirado e adaptado de Lubzens et al., 2010).

Figura 2. Resumo esquemático dos possíveis mecanismos de controle do estradiol na renovação de espermatogônias e da ação de 11ceto-testosterona (11KT) no início da espermatogênese em peixes. (Retirado e traduzido de Miura e Miura 2003).

Figura 3. Resumo esquemático dos papéis de FSH, regulando os processos durante a fase mitótica, e do LH, importante papel durante os processos de regulação da fase espermiogênica durante a espermatogênese de peixes (Retirado e traduzido de Schulz et al., 2010).

Figura 4. **A-** Exemplar de *Epinephelus marginatus* em ambiente natural (foto: autor desconhecido). **B-** Exemplar de *Epinephelus marginatus* na caixa com água e anestésico.

Figura 05. **A-** Biometria dos animais. **B-** Introdução do *chip* identificador.

Figura 6. **A-** Vista parcial dos tanques escavados no município de Ilha Bela/SP. **B-** *Pellet* utilizando manteiga de cacau como veículo (seta amarela) e não absorvido na cavidade abdominal de *Epinephelus marginatus*.

Figura 7. **A-** Vista externa da estufa no CEBIMar. **B-** Vista parcial do tanque circular na interior da estufa.

Figura 8. **A-** Coleta de espermatozoides com seringa. **B-** Coleta de espermatozoides com pipeta automática. **C-** Sêmen em lâmina para verificação da motilidade dos espermatozoides. **D-** Espermatozoides de *Epinephelus marginatus* (aumento 400x).

Figura 9. Eletroforese do produto de PCR utilizando-se o gradiente de 9 temperaturas de associação dos *primers* degenerados para hormônio folículo estimulante (FSH) aplicados em gel de agarose 2%. Marcador 100 pb. Os círculos vermelhos evidenciam os produtos de amplificação obtidos (53,6 e 57,7° C, respectivamente) e utilizados na reação de ligação.

Figura 10. Eletroforese do produto de PCR utilizando-se o gradiente de 9 temperaturas de associação dos *primers* degenerados para hormônio luteinizante (LH) aplicados em gel de agarose 2%. Marcador 100 pb. O círculo vermelho evidencia o produto de amplificação obtido (58,8° C) e utilizado na reação de ligação.

Figura 11. Eletroforese do produto de PCR da digestão plasmidial de FSH e LH respectivamente aplicados em gel de agarose 2%. Marcador 100pb.

Figura 12. Eletroforese do produto de PCR utilizando-se o gradiente de 9 temperaturas de associação dos *primers* para o fator de alongação EF1 α aplicados em gel de agarose 2%. Marcador 100 pb. Os círculos vermelhos evidenciam os produtos de amplificação obtidos com os *primers* BMC (*E. bruneus*, *M. rosacea*, *E. coiodes*) e BSM (*E. bruneus*, *E. septemfaciatus*, *M. rosacea*) a 57,8 $^{\circ}$ C e utilizados na reação de ligação.

Figura 13. Eletroforese do produto de PCR da digestão plasmidial do fator de alongação EF1 α aplicado em gel de agarose 2%. Marcador 100pb e 1Kb.

Figura 14. Eletroforese do produto não digerido de PCR da digestão plasmidial de FSH, LH e EF1 α tratados com a enzima Scal, aplicado em gel de agarose 2%.

Figura 15. Curva de amplificação do PCR em Tempo Real. CT - Cycle Threshold. A amplificação mostra 3 fases distintas (1) linha basal: não houve produtos da PCR suficiente para detectar a fluorescência; (2) fase log: a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo e (3) fase platô: não há mais aumento no número de produtos (Fonte: Novaes, 2004).

Figura 16. Coleta das gônadas. **A-** Grupo controle. **B-** Grupo experimental.

Figura 17. Experimento1. *Epinephelus marginatus*, grupo controle. Secções histológicas das estruturas dos ovários de fêmeas imaturas apresentando somente ovócitos em crescimento primário, folículo ovariano delgado sem células foliculares evidentes. **A)** Organização da gônada e epitélio germinativo. Cápsula gonadal (CG), lamela (L) e vaso sanguíneo (Vs). **B)** Ovócito em crescimento primário com múltiplos nucléolos (PGmn) (*multiple nucleolar*). **C)** Região terminal da lamela observando a cavidade luminal (CLu), ovócito em crescimento primário com um único nucléolo (PGon) (*one nucleolus*) e células pré-foliculares (PF). **D)** Ninhos de ovogônias (No), ovócito em crescimento primário com múltiplos nucléolos (PGmn) (*multiple nucleolar*). **E)** Região do núcleo (N), nucléolo (Nu) e tecido intersticial (Ti). **F)** Ninho de Ovogônia (No), e ovócito em crescimento primário perinucleolar (PGpn) (*Perinucleolar*). Coloração hematoxilina e eosina. (A) Barra 100µm. (B), (D), (F) Barra 10µm. (C) Barra 20µm. (E) Barra 30µm.

Figura 18. Experimento1. *Epinephelus marginatus*, grupo experimental tratado com inibidor de aromatase. Secções histológicas apresentando as estruturas das gônadas de fêmeas sexualmente invertidas a machos que apresentaram espermição ao final de 60 dias após o início do experimento. **A)** Estrutura lamelar (L), cavidade luminal (CLu), cistos de espermatídes (St) (*spermatid*), espermatozoides na luz (Sz) (*spermatozoa*). **B)** Espermatogônias (Sg) (*spermatogonia*), espematócitos (Sc) (*spermatocyte*) e espermatídes (St) **C)** Espematócitos (Sc), espermatozoides (Sz) e ovócito em degeneração (Od). **D)** Cisto de espermatídes (St), espermatozoides (Sz) e ovócito em degeneração (Od). **E)** Espematócitos (Sc) e ovócito em degeneração (Od). **F)** Espermatogônia (Sg), espermatozoides (Sz) e célula de Sertoli (Se). Coloração hematoxilina e eosina. (A) Barra 50µm. (B) e (D), Barra 10µm. (C) Barra 8µm. (E) Barra 10µm. (F) Barra 5µm.

Figura 19. A: Experimento 1. Testosterona plasmática (pg /mL). **B-**Estradiol plasmático (pg /mL). **C-** 11-cetotestosterona plasmática (pg/mL) **D-** 17-alfaOHprogesterona plasmática (pg/mL) de *Epinephelus marginatus* (garoupa). Grupos controle e experimental (IA) inicial, aclimatado. Grupos controle e experimental (IA) 30 dias após o início do experimento. Grupos controle e experimental 60 dias após o início do experimento. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro do grupo experimental ou controle no período de tempo ao longo do experimento. Sinais # e * significam valores estatisticamente diferentes entre os grupos experimental e controle no mesmo momento do experimento (média ± EPM).

Figura 20. **A:** Experimento 1. Proteínas totais musculares (mg /g). **B-** Proteínas totais do fígado (mg /g). **C-** Proteínas totais plasmática (mg/mL) de *Epinephelus marginatus* (garoupa). Grupos controle e experimental (IA) após 60 dias do início do experimento (média $\pm$ EPM).

Figura 21. Experimento 2. *Epinephelus marginatus*, grupo controle. Secções histológicas das estruturas dos ovários de fêmeas imaturas apresentando somente ovócitos em crescimento primário, folículo ovariano delgado sem células foliculares evidentes. **A)** Organização da gônada e epitélio germinativo. Cápsula gonadal (CG), lamela (L) e vaso sanguíneo (Vs). **B)** Cápsula gonadal (CG), vaso sanguíneo (Vs), células produtoras de esteroides (CPe) e ovócito em crescimento primário multinucleolar (PGmn) (*multiple nucleolar*). **C)** Tecido intersticial (Ti), ovócito em crescimento primário perinucleolar (PGpn) (*perinucleolar*). **D)** Ovócito em crescimento primário perinucleolar (PGpn) e ninho de ovogônias (No). **E)** Tecido intersticial (Ti), ninho de ovogônias (No), ovócito em crescimento primário com um único nucléolo (PGon) (*one-nucleolus*). **F)** Região nuclear (N), nucléolo (Nu), ovogônia (Og) e ovócito em crescimento primário com um único nucléolo (PGon). Coloração hematoxilina e eosina. (A) Barra 80µm. (B), (C), (D), (E) e (F) Barra 20µm.

Figura 22. Experimento 2. *Epinephelus marginatus*, grupo experimental, tratado com inibidor de aromatase. Secções histológicas apresentando as estruturas das gônadas de fêmeas parcialmente invertidas a machos (intersexo) que não apresentaram espermiacção ao final de 60 dias após o início do experimento. **A)** Estrutura lamelar (L), cápsula gonadal (CG), desorganização da estrutura gonadal (Dag) e ovócito em degeneração (Od). **B)** Vaso sanguíneo (Vs), hemácias (H), cistos de espermatócitos (Sc) (*spermatocyte*), desorganização da estrutura gonadal (Dag), ovócito em degeneração (Od) e proliferação do tecido intersticial (PTi). **C)** Cápsula gonadal (CG), cisto de espermatócito (Sc), desorganização da estrutura gonadal (Dag) e ovócito em degeneração (Od). **D)** Cistos de espermatócitos (Sc) e ovócito em degeneração (Od). **E)** Cápsula gonadal (CG), ovócito em degeneração (Od), formação de cisto de espermatogônias (CSg) (*spermatogonia*), cisto de espermatócitos (Sc) e cisto de espermatídes (St) (*spermatid*). **F)** Ovócito em degeneração (Od) e cisto de espermatócitos (Sc). Coloração hematoxilina e eosina. (A) Barra 80µm. (B) e (C) Barra 50µm. (D) e (E) Barra 20µm. (F) Barra 8µm.

Figura 23. **A:** Experimento 2. Testosterona plasmática (pg /mL). **B-**Estradiol plasmático (pg /mL). **C-** 11-cetotestosterona plasmática (pg/mL) **D-** 17-alfaOHprogesterona plasmática (pg/mL) de *Epinephelus marginatus* (garoupa). Grupos controle e experimental (IA) inicial, aclimatado. Grupos controle e experimental (IA) 30 dias após o início do experimento. Grupos controle e experimental 60 dias após o início do experimento. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro do grupo experimental ou controle no período de tempo ao longo do experimento. Sinais # e * significam valores estatisticamente diferentes entre os grupos experimental e controle no mesmo momento do experimento (média $\pm$ EPM).

FSH

GCA GAC AGC TGG GTA TGT CTC CAG GAA AGC GCC
 CGC AGT ACG TGT TTC CTG CGT TAC ACG CCG TGC
 ACT TGC AGT TTC TGG CCA CAG GGT AGG TGA CGC
 CCA CTG GAC ATC CTT GGA AGT GTT TCA CCT CAT
 AGG TCC AGT CCC CGT TGC AGA CTT TCT GTT CAG
 CCC AGT CAT CGG GGC CGA TGT AGA CCG GAT CCT
 TGT GGT AAC ACT GTC CTT CAC ATA TGG TGG TGT
 AGA TGT ACT CGG TGC GGC CGC AGC TCT CCA CGG
 TGA TGC TGA TGT TG GTA

LH

TCT GTG GAG AAG GAG GGC TGT CCA AAG TGT CAC
 CCA GTG GAA ACA ACC ATC TGC AGC GGT TAC TGC
 ATC ACC AAG GAC CCT GTC ATC AAG ATA CCA TTC
 AGC AAT GTG TAC CAG CAT GTG TGC ACG TAC CGG
 GAC TTG TAC TAC AAG ACA TTT GAG CTT CCT GAC TGT
 CCT CCC GGC GTG GAC CCG ACT GTC ACC TAC CCT
 GTG GCT TTG AGC TGC CAC TGC GGG CGC TGT GCC
 ATG GAC ACT TCC GAC TGT ACC ATC GA

EF1 α

TAC CAA GGG TGA AGG CCA GCA GGG CGT GCT CAC
 GGG TCT GTC CGT TCT TGG AGA TAC CAG CTC TCA
 AAC TCA CCA ACG CCA GCA GCC ACG ATC AGC ACG
 GCG CAG TCA GCC TGA GAG GTA CCA AA

Figura 24. Sequências parciais de FSH e LH de *Epinephelus marginatus*.

Figura 25. Experimento 2. **A-** Número de cópias do mRNA de FSH normalizado pelo número de cópias do mRNA do EF1 α no grupo controle e experimental (IA) após 60 dias do início do experimento. **B-** Número de cópias do mRNA de LH normalizado pelo número de cópias do mRNA do EF1 α no grupo controle e experimental (IA) após 60 dias do início do experimento. **C-** Comparação entre o número de cópias do mRNA de FSH normalizado e o número de cópias do mRNA do LH normalizado considerando somente os animais do grupo controle. **D-** Comparação entre o número de cópias do mRNA de FSH normalizado e o número de cópias do mRNA do LH normalizado considerando somente os animais do grupo experimental (IA).

Figura 26. Experimento 2. **A-** Proteínas totais musculares (mg /g). **B-** Proteínas totais do fígado (mg /g). **C-** Proteínas totais plasmática (mg/mL) de *Epinephelus marginatus* (garoupa). Grupos controle e experimental (IA) 60 dias após o início do experimento. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes (média $\pm$ EPM).

Figura 27. Experimento 3. *Epinephelus marginatus*, grupo controle. Secções histológicas apresentando as estruturas dos ovários de fêmeas em desenvolvimento apresentando ovócito em crescimento primário perinucleolar (PGpn) (perinucleolar), cortical alveolar (Pgca) (*cortical alveolar*). **A)** Região terminal da lamela observando a cavidade luminal (CLu), ovócito em crescimento primário perinucleolar (PGpn). **B)** Ovócito em crescimento primário perinucleolar (PGpn) e ninhos de ovogônias (No). **C)** Ovócito em crescimento primário perinucleolar (PGpn), ninho de ovogônias (No) e células foliculares (f). **D)** Região apresentando ninhos de ovogônias (No), ovócito em crescimento primário perinucleolar (PGpn), setas evidenciando os nucléolos. **E)** Ovócito em crescimento cortical alveolar (PGca), seta demonstrando a presença de deposição lipídica na periferia do ovócito, células foliculares (f). **F)** Seta evidenciando a zona radiata no ovócito em crescimento cortical alveolar (PGca). Coloração hematoxilina e eosina. (A) Barra 80µm. (B), (D) Barra 20µm. (C) Barra 10µm. (E) Barra 30µm. (F) Barra 8µm.

Figura 28. Experimento 3. *Epinephelus marginatus*, grupo experimental, tratado com Inibidor de aromatase. Secções histológicas apresentando as estruturas das gônadas de fêmeas sexualmente invertidas a machos que apresentaram espermição ao final de 77 dias de experimento. As gônadas invertidas apresentam: **A e B)** Estrutura lamelar (L), cavidade luminal (CLu), cistos de espermatócitos (Sc), cistos de espermatócitos (St), espermatozoides na luz (Sz). **C)** Espermatogônias (Sg), espermatócitos (Sc) e cisto rompido com espermatozoides (Sz), setas evidenciando as células de Sertoli (Se). **D)** Espermatogônias (Sg), espermatócitos (Sc) e espermatozoides (Sz). **E)** Espermatogônias (Sg), espermatócitos (Sc) e espermatozoides na luz (Sz) e ovócito em degeneração (Od). **F)** Espermatócitos (Sc), célula de Sertoli (Se) e espermatozoides (Sz). Coloração hematoxilina e eosina. (A) Barra 100µm. (B) Barra 50µm. (C) e (E) Barra 20µm. (D) Barra 8 µm. (F) Barra 10µm.

Figura 29. Experimento 3. **A-** Testosterona plasmática (pg /mL). **B-**Estradiol plasmático (pg /mL). **C-** 11-cetotestosterona plasmática (pg/mL) **D-** 17-alfaOHprogesterona plasmática (pg/mL) de *Epinephelus marginatus* (garoupa). Grupos controle e experimental (IA) inicial, aclimatado. Grupos controle e experimental (IA) 30 dias após o início do experimento. Grupos controle e experimental 77 dias após o início do experimento. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro do grupo experimental ou controle no período de tempo ao longo do experimento. Sinais # e * significam valores estatisticamente diferentes entre os grupos, experimental e controle no mesmo momento do experimento (média ± EPM).

Figura 30. Experimento 3. **A-** Número de cópias do mRNA de FSH normalizado pelo número de cópias do mRNA do EF1A no grupo controle e experimental (IA) após 77 dias do início do experimento. **B-** Número de cópias do mRNA de LH normalizado pelo número de cópias do mRNA do EF1A no grupo controle e experimental (IA) após 77 dias do início do experimento. **C-** Comparação entre o número de cópias do mRNA de FSH normalizado e o número de cópias do mRNA do LH normalizado considerando somente os animais do grupo controle. **D-** Comparação entre o número de cópias do mRNA de FSH normalizado e o número de cópias do mRNA do LH normalizado considerando somente os animais do grupo experimental (IA). Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes.

Figura 31. **A:** Proteínas totais musculares (mg /g). **B-** Proteínas totais do fígado (mg /g). **C-** Proteínas totais plasmática (mg/mL) de *Epinephelus marginatus* (garoupa). Experimento 3. Grupos controle e experimental (IA), 60 dias após o início do experimento (média $\pm$ EPM).

Figura 32: Exemplar de garoupa adulta, pelo tamanho provavelmente macho; exposto à venda no Mercado Municipal de Peixes na cidade de Ubatuba-SP.