

Marta Sofia Sá Ferreira

**Endocrinologia da Reprodução  
em Fêmeas de Congro,  
*Conger conger* (L.)**

Porto, 2001

---

Marta Sofia Sá Ferreira

**Endocrinologia da Reprodução em Fêmeas de  
Congro, *Conger conger* (L.)**

**Mestrado em Ciências do Mar – Recursos Marinhos**  
(Biologia Marinha)

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar  
Universidade do Porto  
Porto, 2001

---

---

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar para a obtenção do grau de Mestre em Ciências do Mar - Recursos Marinhos, área científica de Biologia Marinha (Resolução 12/SC/95, D.R. n.º 169, II Série de 24 de Julho de 1995).

Este trabalho foi orientado pela  
**Professora Doutora Maria Armanda Reis Henriques**

Figura de Capa: Secção de ovário de fêmea de congro, *Conger conger*. Ampliação 100x.

---

---

Under the most rigorously controlled conditions of pressure, temperature, humidity, and other variables, the organism will do as it damn well pleases.

*Anonymous*

---

---

*Aos meus pais...*  
*Por tudo e, principalmente por acreditarem...*

---

---

## Agradecimentos

Aqui quero expressar, de forma sincera, o meu muito obrigado a todos os que directa, ou indirectamente, contribuíram para que a elaboração deste trabalho fosse possível.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Armada Reis Henriques, e coordenadora deste mestrado, o meu muito obrigado por ter acreditado em mim, e me ter apoiado ao longo dos anos em que me encontro a trabalhar na sua equipa de investigação. Quero ainda agradecer a sua total disponibilidade para a resolução de todos os problemas de forma a aperfeiçoar o estudo em causa.

Ao Professor Doutor Eduardo Rocha o meu obrigado pela ajuda prestada na resolução de alguns problemas que surgiram no decorrer deste estudo.

Ao Professor Doutor Emídio Ferreira Gomes, e em especial à Dra. Alice Santos, agradeço o apoio técnico cedido para o doseamento de ácidos gordos, parte integrante deste trabalho.

Ao Dr. Manuel Biscoito da Estação de Biologia Marinha do Funchal o meu agradecimento pela forma como fui recebida, tornando possível uma amostragem realizada na Madeira, e à Dra. Mafalda Freitas por me ceder algumas fotografias importantes para este trabalho.

Ao Doutor Eduardo Isidro pelo apoio dado numa colheita de material biológico efectuada nos Açores, o meu obrigado.

Ao Dr. Alberto Correia pela recolha de parte do material biológico, e preparações histológicas que foram cedidas, tornando possível a concretização deste estudo, o meu obrigado.

---

Aos membros do Laboratório de Fisiologia Aplicada do ICBAS, em especial à Eng. Laurinda Silva, pela simpatia e amizade, e por todos os ensinamentos que me transmitiram.

À minha família, meus pais e irmã, por todo o apoio emocional, e por acreditarem, tornando este estudo mais fácil de realizar, os meus maiores agradecimentos.

Ao Rui, simplesmente por estar sempre ao meu lado e me apoiar, o meu muito obrigado.

Aos meus amigos, e colegas de mestrado agradeço a amizade e apoio.

A todos os elementos do CIIMAR, que de uma forma ou de outra ajudaram e tornaram possível este trabalho, o meu muito obrigado.

---

## Resumo

O congro, *Conger conger* (L.), é uma espécie abundante na costa Atlântica de Portugal, sendo largamente consumido, principalmente nas zonas piscatórias. Mas, e apesar da sua importância económica, é ainda muito pouco conhecido o seu ciclo completo de vida, nomeadamente o desenvolvimento das gónadas e local de postura.

Este trabalho teve como objectivo o conhecimento da biologia da reprodução de fêmeas desta espécie, para o qual foram utilizados 24 espécimes com IGS entre 0,20 e 6,0% capturados em Vila Praia D'Âncora, Madeira e Açores e Vigo, em Espanha.

Pela análise histológica dos ovários foi possível observar apenas oócitos em crescimento primário, com diâmetro médio compreendido entre 20 e 60  $\mu\text{m}$ , e em vitelogénese, com diâmetro médio até 150  $\mu\text{m}$ . Com o desenvolvimento dos oócitos verifica-se no ovário um maior número de células adiposas que contribuem para o aumento do IGS, e por isso este não será um indicador seguro da fase do ciclo reprodutivo, como acontece nas espécies já estudadas.

Por RIA foram quantificadas duas hormonas esteróides no sangue, T e E2, que se verificou aumentarem com o desenvolvimento sexual, sendo a T o esteróide sempre em maior quantidade. A VTG encontra-se presente no sangue mas em níveis baixos (8-10  $\mu\text{gPi/ml}$  plasma), e sem qualquer correlação com a fase do ciclo do animal.

A partir de incubações *in vitro* de fragmentos de ovário tratados com colagenase específica para adipócitos, de forma a obter uma fracção mais rica em oócitos, verificou-se que estes têm a capacidade de sintetizarem T (285,8 pg/g ovário) e E2 (86,4 pg/g ovário), sendo superiores os níveis de T produzidos, indicando reduzida actividade da aromatase, sendo a produção de T (407,8 pg/g ovário) e de E2 (107,0 pg/g ovário) superior na presença de um precursor exógeno, a 17P. Pela adição ao meio de incubação, de uma suspensão de hipófise de truta em fase vitelogénica, não se observou qualquer aumento na produção de T (406,1 pg/g ovário) e de E2 (96,8 pg/g ovário).

O ovário desta espécie, quando mais desenvolvido, apresenta maior quantidade de células adiposas, que podem ocupar até 80% do ovário. Os lípidos presentes são ricos em ácidos gordos de cadeia longa, C16:0, C16:1 e C18:0, tal como se verifica em outras espécies. Esta espécie poderá ter a capacidade de alongar e desnaturar ácidos gordos em

---

EPA e em DHA, dois ácidos gordos importantes para a qualidade dos ovos, e consequentemente para a sobrevivência das larvas.

O tratamento hormonal com LHRHa associada ao PIM e a 17P como precursor, levou à activação do eixo hipotálamo-hipófise-gónada. O diâmetro dos oócitos foi superior (230  $\mu\text{m}$ ) ao observado para animais selvagens. Os níveis no sangue de A, de T e de E2, aumentaram, com a T e o E2 até um máximo de 62 e 64 %, respectivamente. O esteróide maturativo, 17,20 $\beta$ P, foi detectado em baixas quantidades por HPLC, apenas com o primeiro sistema de eluição. Os níveis de VTG mantiveram-se baixos, aumentando 80 % após administração de E2 ao animal.

A incubação de fragmentos de ovário do animal tratado com LHRHa, PIM e 17P mostrou um aumento de A, T e E2, no meio de incubação, quando comparado com o controlo.

---

## Abstract

The conger eel, *Conger conger* (L.), is a common species off the Atlantic coast of Portugal, and supports commercial food fisheries. Despite its economic relevance, aspects of its life cycle are still unknown, namely the gonadal development and spawning area.

The aim of this work was to contribute to the knowledge of reproductive biology in female conger. Twenty-four specimens were used with gonadosomatic indices (GSI) between 0,20 and 6,0 %, captured in Vila Praia D'Âncora, Madeira and the Azores, Portugal and Vigo, Spain.

By the histological analysis of the ovaries it was possible to observe oocytes in primary growth, with diameters that ranged from 20 to 60  $\mu\text{m}$ , and in a vitellogenic stage, measuring up to 150  $\mu\text{m}$ . With the development of the oocytes we observed more adipose cells in the ovary that increased the GSI, indicating that this is not a good indicator of the reproductive stage like in other species.

The levels of two steroids were measured in the blood, testosterone (T) and  $17\beta$ -estradiol (E2). The levels of T and E2 increased with sexual development, with the T levels higher than E2. The vitellogenin (VTG) is present in the blood but only in low levels (8-10  $\mu\text{gPi/ml}$  plasma), and with no correlation with the sexual status.

Follicles were incubated *in vitro* after treatment with collagenase specific for adipocytes, and retained their ability to synthesise T (285,8 pg/g ovary) and E2 (86,4 pg/g ovary). The higher levels of T suggest reduced activity of aromatase, and in the presence of an exogenous precursor, 17P, the synthesis of T (407,8 pg/g ovary) and E2 (107,0 pg/g ovary) was higher. The introduction to the incubation media, of a suspension of vitellogenic trout pituitary caused no increase of T (406,1 pg/g ovary) and E2 (96,8 pg/g ovary) levels.

The ovary of this species, when more developed, showed adipose tissue that occupied up to 80 % of the ovary. The lipids present were rich in long chain fatty acids like C16:0, C16:1 and C18:0, as in other species. This species could have the ability to elongate and to denaturate these fatty acids in to EPA and DHA, two fatty acids important to egg quality, and consequent larval survival.

The hormonal treatment of conger with LHRHa in association with PIM, and 17P activated the hypothalamus-pituitary-gonadal axis. The oocyte diameter was higher (230  $\mu\text{m}$ ) than in untreated animals. The levels of A, T and E2 in the blood increased with T and

---

E2 levels increasing up to 62 and 64%, respectively. The maturative steroid, 17,20BP, was detected in low levels by HPLC, but only in the first elution system in the hormonally treated animals. The VTG levels increased (80 %) only after the administration of E2 to the animal.

The incubation of ovary fragments from the conger treated with LHRHa, PIM and 17P resulted in an increase of A, T and E2 in the incubation medium when compared to the control.

---

## Abreviaturas

**IGS** – Índice Gonadossomático

**GnRH** – Hormona Libertadora das Gonadotropinas

**GTH** – Gonadotropina

**LH** – Hormona Luteinizante

**FSH** – Hormona Estimuladora dos Folículos

**NAD** – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

**NADPH** – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

**VTG** – Vitelogenina

**E2** – 17 $\beta$ -Estradiol

**17,20 $\beta$ P** – 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -Dihidroxi-4-pregnen-3-ona

**17,20 $\beta$ ,21P** – 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-Trihidroxi-4-pregnen-3-ona

**EIM** – Esteróide Indutor da Maturação

**FIM** – Factor Indutor da Maturação

**20 $\beta$ -HSD** – 20 $\beta$ -Dihidroxiesteróide Desidrogenase

**17P** – 17 $\alpha$ -Hidroxiprogesterona

**AG** – Ácido Gordo

**EFA** – Ácido Gordo Essencial

**MUFA** – Ácido Gordo Mono Insaturado

**PUFA** – Ácido Gordo Poli Insaturado

**HUFA** – Ácido Gordo Altamente Insaturado

**EPA** – Ácido Eicosapentaenóico

**DHA** – Ácido Docosaheptaenóico

**HE** – Hematoxilina de Mayer – Eosina

**RIA** – Radioimunoensaio

**Pi** – Fósforo Inorgânico

**ND** – Não Detectado

**TCA** – Ácido Tricloroacético

**HBSS** – Hank's Balanced Salt Solution

**LHRHa** – Análogo da Hormona Libertadora da Hormona Luteinizante

**PIM** – Pimozide

---

**DOM** – Domperidon

**SPE** – Extracto de Hipófise de Salmão

**HCG** – Hormona Coriônica Humana

**PC** – Peso Corporal

**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Pressão

**TLC** – Cromatografia Camada Fina

**Tr** – Tempo de Retenção

---

# Índice

<b>CAPÍTULO I – Introdução Geral.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II – Endocrinologia da Reprodução em Fêmeas de Congro, <i>Conger conger</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>4</b>
1. Desenvolvimento do ovário.....	6
2. Hormonas esteróides .....	7
2.1. Estrogénios e fase vitelogénica.....	9
2.2. Progestagénios e maturação.....	9
2.3. Androgénios .....	11
3. Ácidos gordos no ovário.....	11
<b>Objectivos .....</b>	<b>12</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>14</b>
1. Material biológico .....	14
2. Morfologia do ovário.....	14
3. Compostos químicos .....	15
4. Quantificação de esteróides plasmáticos .....	15
5. Quantificação da vitelogenina plasmática .....	16
6. Lípidos e ácidos gordos do ovário.....	16
6.1. Extração dos lípidos do ovário.....	16
6.2. Quantificação dos ácidos gordos .....	17
7. Incubação <i>in vitro</i> de ovário .....	17
8. Quantificação de esteróides produzidos <i>in vitro</i> .....	18
9. Análise estatística .....	19
<b>Resultados Obtidos.....</b>	<b>20</b>
1. Morfologia do ovário.....	20
2. Níveis de vitelogenina plasmática .....	24
3. Níveis de testosterona e 17 $\beta$ -estradiol plasmáticos.....	24
4. Esteroidogénese <i>in vitro</i> .....	25
5. Análise qualitativa dos ácidos gordos. ....	31
<b>Discussão .....</b>	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO III – Indução da Maturação em Fêmeas de Congro, <i>Conger conger</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>37</b>
<b>Objectivos.....</b>	<b>40</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>41</b>
1. Material biológico .....	41
2. Indução da maturação sexual com LHRHa e PIM. ....	41

---

3. Morfologia do ovário.....	42
4. Compostos químicos .....	42
5. Quantificação de esteróides plasmáticos .....	42
6. Quantificação da vitelogenina plasmática .....	43
7. Incubação <i>in vitro</i> de ovário .....	44
8. Quantificação de esteróides produzidos <i>in vitro</i> .....	44
9. Análise estatística .....	44
<b>Resultados Obtidos .....</b>	<b>45</b>
1. Morfologia do ovário.....	45
2. Níveis de esteróides plasmáticos .....	45
3. Níveis de vitelogenina plasmática .....	50
4. Esteroidogênese <i>in vitro</i> .....	51
<b>Discussão .....</b>	<b>53</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>58</b>

---

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Desenho de um espécimen de <i>C. conger</i> e mapa de distribuição da espécie.....	1
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática do mecanismo que controla a função reprodutora nos teleósteos. ....	5
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática da síntese de algumas hormonas esteróides.....	8
<b>Figura 4:</b> Esquema representativo do desenvolvimento dos oócitos.....	10
<b>Figura 5:</b> Ovário de congro. ....	20
<b>Figura 6:</b> Ovário de congro, mais desenvolvido.....	21
<b>Figura 7:</b> Correlação entre o diâmetro médio dos oócitos e a classe de IGS. ....	21
<b>Figura 8:</b> Secção de ovário de uma fêmea com IGS<1% apresentando oócitos em crescimento primário. ....	22
<b>Figura 9:</b> Secção de ovário de uma fêmea com IGS>1% apresentando oócitos vitelogénicos. ....	23
<b>Figura 10:</b> Quatro fases de desenvolvimento dos oócitos de fêmeas de congro. ....	24
<b>Figura 11:</b> Níveis de T e de E2 de acordo com o desenvolvimento dos oócitos.....	25
<b>Figura 12:</b> Níveis de T produzida pelo ovário após acção da tripsina e com a colagenase.....	26
<b>Figura 13:</b> Níveis de E2 produzido pelo ovário após acção da tripsina e da colagenase. ....	27
<b>Figura 14:</b> Correlação entre classes de IGS e percentagem de lípidos totais presentes no ovário. ....	28
<b>Figura 15:</b> Níveis de T e de E2 produzidos pelo ovário.....	29
<b>Figura 16:</b> Níveis de T e de E2 produzidos pelo ovário, sem os lípidos totais do ovário. ....	29
<b>Figura 17:</b> Níveis de T produzida pelo ovário em diferentes estados de desenvolvimento. ....	30
<b>Figura 18:</b> Níveis de E2 produzido pelo ovário em diferentes estados de desenvolvimento. ....	31
<b>Figura 19:</b> Modelo de regulação neuroendócrina da secreção de GTH-II em fêmeas de peixe dourado. ....	39
<b>Figura 20:</b> Secção de ovário de fêmea injectada com LHRHa, PIM e 17P.....	45
<b>Figura 21:</b> Cromatograma a 254 nm da separação dos quatro esteróides padrão (17P, A, T e 17,20βP) feita pelo método I com acetonitrilo:água como eluente. ....	47
<b>Figura 22:</b> Cromatograma a 254 nm da separação dos quatro esteróides padrão (17P, A, T e 17,20βP) feita pelo método II com metanol:água como eluente. ....	47
<b>Figura 23:</b> Cromatograma a 254 nm da separação de extracto de plasma de congro pelo método I de HPLC. ....	49
<b>Figura 24:</b> Cromatograma a 254 nm da separação de extracto de plasma de congro após separação pelo método I de HPLC e TLC.....	49
<b>Figura 25:</b> Níveis de T e de E2 sintetizados pelo ovário do congro 1.....	51
<b>Figura 26:</b> Níveis de T e de E2 sintetizados pelo ovário, sem os lípidos totais, do congro 1. ....	52

---

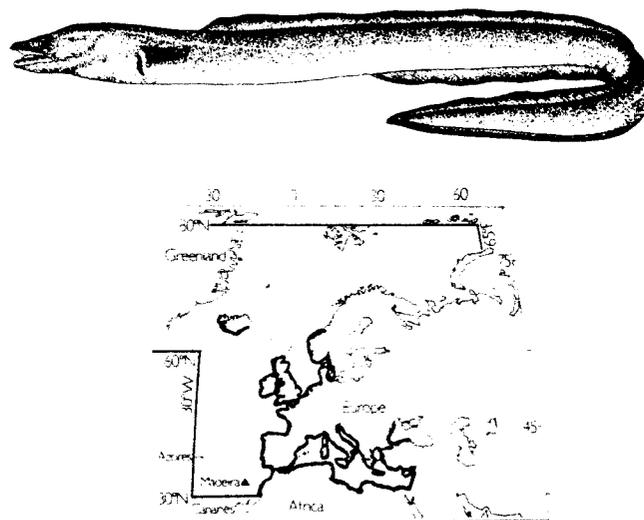
## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Perfil de ácidos gordos dos lípidos presentes na gónada de fêmeas <i>C. conger</i> . .....	32
<b>Tabela 2:</b> Quantidade de T e de E2 plasmática e aumento entre cada dose verificados nos congros 1 e 2. ....	46
<b>Tabela 3:</b> Esteróides detectados e recolhidos no método I de HPLC. ....	48
<b>Tabela 4:</b> Esteróides detectados no método II de HPLC, após TLC. ....	48
<b>Tabela 5:</b> Níveis de VTG no plasma do congro 2 injectado com LHRHa, PIM e 17P. ....	50

## CAPÍTULO I – Introdução Geral

O congro, *Conger conger* (L.), é uma espécie abundante na costa Atlântica de Portugal, com desembarques que têm atingido entre as 700 e as 3000 toneladas nos últimos anos (Villalonga, 1999), sendo de 1681 toneladas no ano de 2000 (Direcção Geral das Pescas), e largamente consumido, principalmente nas zonas piscatórias. Mas, e apesar da sua importância económica, ainda não é totalmente conhecido o seu ciclo completo de vida, nomeadamente o desenvolvimento das gónadas e local de postura.

Esta espécie pertence à ordem dos anguiliformes, família congridae. Segundo Bauchot e Saldanha (1986), apresenta corpo alongado, tipo cobra, ligeiramente comprimido anteriormente, e mais comprimido após o poro urogenital. A sua coloração é cinzento escuro, apresentando uma linha lateral branca. As barbatanas dorsal e anal são negras nas margens. Podem medir até 3 m, sendo os machos de menores dimensões que as fêmeas. Os indivíduos desta espécie habitam fundos rochosos ou arenosos da plataforma continental, e alimentam-se essencialmente de peixes ósseos, crustáceos e cefalópodes. Distribuem-se no Atlântico Este desde o Senegal até à Noruega, Mar Mediterrâneo e Mar Negro Ocidental (fig. 1).



**Figura 1:** Desenho de um espécimen de *C. conger* e mapa de distribuição da espécie (Bauchot e Saldanha, 1986), zonas escuras indicam locais de distribuição.

Quanto ao local de postura do congro, foram formuladas várias hipóteses. Assim em 1931, Schmidt põe a hipótese desta espécie apresentar um comportamento migratório idêntico ao da enguia (*Anguilla anguilla*), que desova no Mar dos Sargaços, ao capturar larvas de *C. conger* no Mar dos Sargaços, em águas no Nordeste do Atlântico e no Mediterrâneo. No entanto, larvas de *C. conger* são raras no Mar dos Sargaços tendo sido descritas larvas de *Conger triporiceps* a oeste do Atlântico por McCleave e Miller (1994). Assim, as larvas capturadas e classificadas como *C. conger*, por Schmidt, eram na realidade *C. triporiceps*. Uma segunda hipótese sugere que a postura ocorre a grandes profundidades entre Gibraltar e os Açores, durante o Verão, sendo os ovos e larvas transportados pela acção das correntes (Wheeler, 1969). Actualmente é aceite que o local de postura do *C. conger* é na Bacia Central-Este do Mediterrâneo (Cau e Manconi, 1983), entre Julho e Setembro, iniciando as larvas, em Novembro, uma migração na direcção NW, para o sul de Portugal e Espanha, estendendo-se a toda a zona Este e Central do Atlântico.

Apesar ser frequente encontrar congros de grandes dimensões, no entanto só muito esporadicamente se capturam fêmeas maduras. Fannon (1990), descreveu uma fêmea com 54,1 Kg, e 2,0 m de comprimento que apresentava a cavidade corporal cheia e distendida; o seu estômago encontrava-se vazio e o ovário pesava 3,17 Kg, com oócitos visíveis a olho nu.

Em *Conger oceanicus* (Hood *et al.*, 1990), um estudo da morfologia das gónadas descreveu apenas oócitos pré-vitelogénicos e vitelogénicos para além das oogónias, não encontrando oócitos maduros. Para o *Conger myriaster*, Okamura *et al.*, (2000), descreveu as mesmas fases de desenvolvimento, não tendo encontrado fêmeas maduras desta espécie, que efectuam uma migração reprodutiva. Em *C. conger*, pela análise da histologia das gónadas de animais capturados na Bacia Central-Este do Mediterrâneo, observaram-se oócitos com acumulação de vesículas de vitelo e, alguns animais com o ovário mais vazio apresentando alguns oócitos em atresia característico da desova (Cau e Manconi, 1984).

O congro é uma espécie da qual se conhece pouco acerca da reprodução. Alguns dados podem fornecer indicações, se bem que nem sempre correctas, relativamente ao seu estado de desenvolvimento sexual. O Índice Gonadossomático (IGS)<sup>1</sup> é uma medida que tem sido usada para definir o estado de desenvolvimento da gónada, mas que nesta espécie, e sobretudo nas fêmeas, pode levar a um resultado que nem sempre está de acordo com a

---

<sup>1</sup> IGS = Peso gónada/Peso total\*100

fase do ciclo reprodutivo. Por isso, a caracterização da morfologia do ovário e a concentração de alguns esteróides plasmáticos também nos permitem estabelecer melhor o padrão de reprodução desta espécie.

## CAPÍTULO II – Endocrinologia da Reprodução em Fêmeas de Congro, *Conger conger*

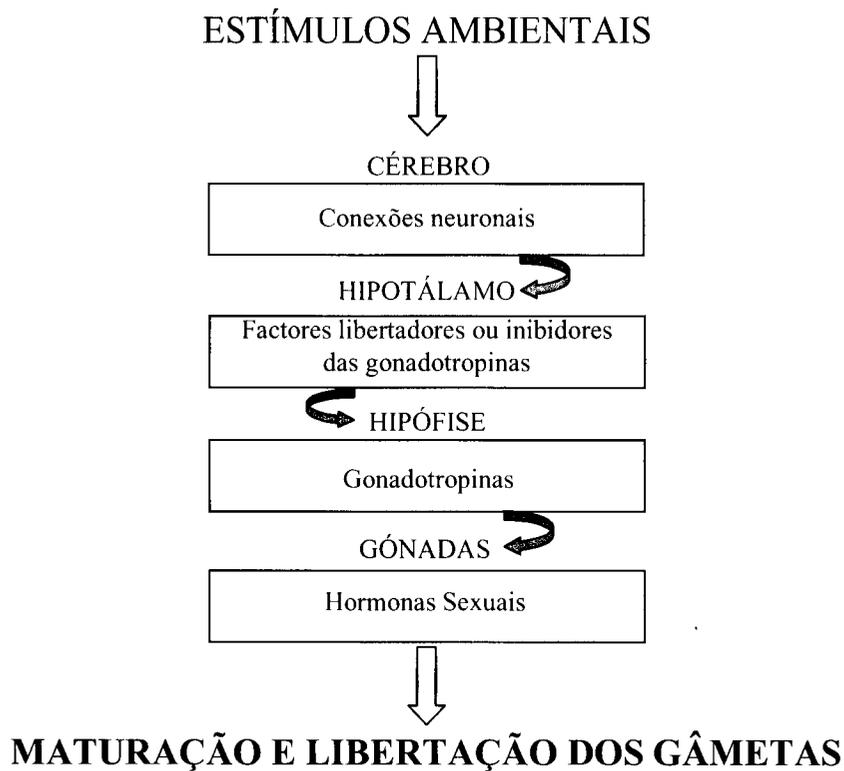
### Introdução

A reprodução impõe aos peixes um grande esforço metabólico sendo uma das fases mais importantes do seu ciclo de vida, pois dela está dependente a propagação da espécie.

O conhecimento do ciclo reprodutivo das espécies e o seu local de postura são factores importantes para a melhor compreensão do seu estilo de vida e, se possível, tentar uma introdução da espécie para fins de cultivo, numa altura em que nos deparamos com várias situações de esgotamento dos stocks, e mesmo espécies em vias de extinção.

Poucas referências existem a estudos feitos na biologia da reprodução desta espécie. A endocrinologia da reprodução aparenta ser desconhecida, não sendo possível descrever aspectos da espécie em estudo, mas sim dos teleósteos em geral.

O ciclo reprodutivo dos teleósteos é, como em todos os vertebrados, regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gónada (fig. 2). O hipotálamo secreta a hormona libertadora das gonadotropinas (GnRH), um decapeptido que regula a síntese de gonadotropinas (GTH) pela hipófise, que por sua vez, controlam a síntese de esteróides pelas gónadas (Yoshikuni, 1991).



**Figura 2:** Representação esquemática do mecanismo que controla a função reprodutora nos teleostes.

A secreção de GTH nos teleostes é regulada por dois sistemas neuroendócrinos, a GnRH que estimula a sua síntese e o factor inibidor que limita a sua secreção (Chang, 1983). A GnRH é um neuropéptido envolvido no controlo da reprodução em teleostes. Na enguia japonesa a expressão do receptor para GnRH na hipófise indica que o receptor da GnRH está presente na hipófise e que a GnRH libertada pelo hipotálamo estimula a síntese e libertação de gonadotropina quando se liga ao receptor (Okuba, 2000).

Todas as espécies de vertebrados tem a característica de possuírem a hipófise que sintetiza e secreta as gonadotropinas. Nos vertebrados terrestres a hipófise secreta dois tipos distintos de gonadotropinas, a hormona luteinizante (LH) e a hormona estimuladora dos folículos (FSH), mas nos peixes, e apesar de se encontrarem duas gonadotropinas (GTH I e GTH II) em alguns teleostes, nenhuma delas é estruturalmente idêntica à LH ou FSH. Estes péptidos são compostos por duas subunidades: a subunidade- $\alpha$ , que é comum a todas as gonadotropinas, e a subunidade- $\beta$  que é específica e que determina a actividade biológica da hormona (Suzuki, 1988a, 1988b). Como as gonadotropinas são péptidos de

grandes dimensões e não atravessam a membrana plasmática, o seu efeito na síntese enzimática é mediado pelo AMPcíclico, que actua como mensageiro entre o receptor localizado na membrana celular e o sistema enzimático. A maior parte destas enzimas requer a presença de co-factores como o NAD ou NADPH.

O papel das duas GTHs no controlo da reprodução nos peixes tem sido estudado, principalmente nos salmonídeos. Nos teleósteos primitivos, tal como as enguias, apenas uma gonadotropina, a GTH II, foi isolada e caracterizada. No entanto na enguia japonesa, *Anguilla japonica*, foi possível provar a existência das duas gonadotropinas, sintetizadas em duas fases distintas do ciclo sexual - a GTH I em animais imaturos e a GTH II em animais maduros (Yoshiura, 1999).

Os esteróides fazem parte dos lípidos totais e actuam como mensageiros químicos numa grande variedade de tecidos, influenciando vários aspectos da biologia do animal. A partir do colesterol (C27), considerado o precursor das hormonas esteróides, são sintetizados os progestagénios (C21) e os corticosteróides (C21), os androgénios (C19) e os estrogénios (C18).

## 1. Desenvolvimento do ovário

A gónada nos teleósteos é uma estrutura dupla localizada na cavidade corporal. Esta estrutura foi descrita por Hood, *et al.* (1988) em *C. oceanicus*, onde as gónadas são estruturas pares, achatadas, brancas e pregueadas que se encontram ao longo da cavidade corporal estendendo-se para além do poro urogenital, sendo mais pregueadas nas fêmeas.

Estruturalmente o ovário dos teleósteos é constituído por oogónias, oócitos, células foliculares e tecido conjuntivo. As células foliculares multiplicam-se formando uma camada à volta do oócito, a granulosa. Da mesma forma, as células do tecido conjuntivo circundante formam uma segunda camada distinta e exterior, a teca. Assim, os folículos são constituídos por uma célula germinativa - o oócito, os tecidos somáticos envolventes, a camada de células interiores - a granulosa, a camada mais exterior - a teca, e o epitélio superficial (Tyler e Sumpter, 1996).

Em todos os teleósteos estudados o desenvolvimento dos oócitos sofre um padrão comum de crescimento, ao qual podem ser atribuídas seis fases, ou períodos, de acordo

com o estado de crescimento do oócito: oogénese, crescimento primário, fase cortico-alveolar, vitelogénese, maturação e ovulação.

Uma fase fundamental dos vertebrados não mamíferos é a acumulação de reservas nutritivas no citoplasma dos oócitos. Este processo, denominado de vitelogénese, envolve a síntese e a captação de vitelogenina (VTG), proteína sintetizada no fígado pela acção do  $17\beta$ -estradiol (E2) e incorporada no oócito por pinocitose (Tyler e Sumpter, 1996). A caracterização bioquímica da VTG mostrou que é uma glicolipofosfoproteína, de elevado peso molecular, 340 KDa na enguia, *Anguilla anguilla*, (Burzawa-Gerard e Dumas-Vidal, 1991), e 550 KDa na truta arco íris, *Oncorhynchus mykiss* (Shibata, *et al.*, 1993). Nos teleósteos, tal como em outros vertebrados ovíparos, a VTG é sequestrada selectivamente para o ooplasma, por endocitose mediada por receptores (Tyler e Lancaster, 1993); estes receptores aumentam em número durante a fase vitelogénica diminuindo imediatamente antes da ovulação (Lancaster e Tyler, 1994). Nos peixes que desovam apenas uma vez, morrendo de seguida, toda a VTG disponível é captada pelo ovário antes da desova (Dye *et al.*, 1986). A VTG uma vez incorporada nos oócitos é hidrolisada em duas outras proteínas de peso molecular inferior, a lipovitelina e a fosfovitina (Tyler e Sumpter, 1996), que constituem a fonte de reservas nutritivas para a primeira fase de crescimento das larvas. Julga-se que esta proteína, além do seu elevado valor nutritivo, funciona também como molécula transportadora de iões, minerais e vitaminas (Specker e Sullivan, 1994).

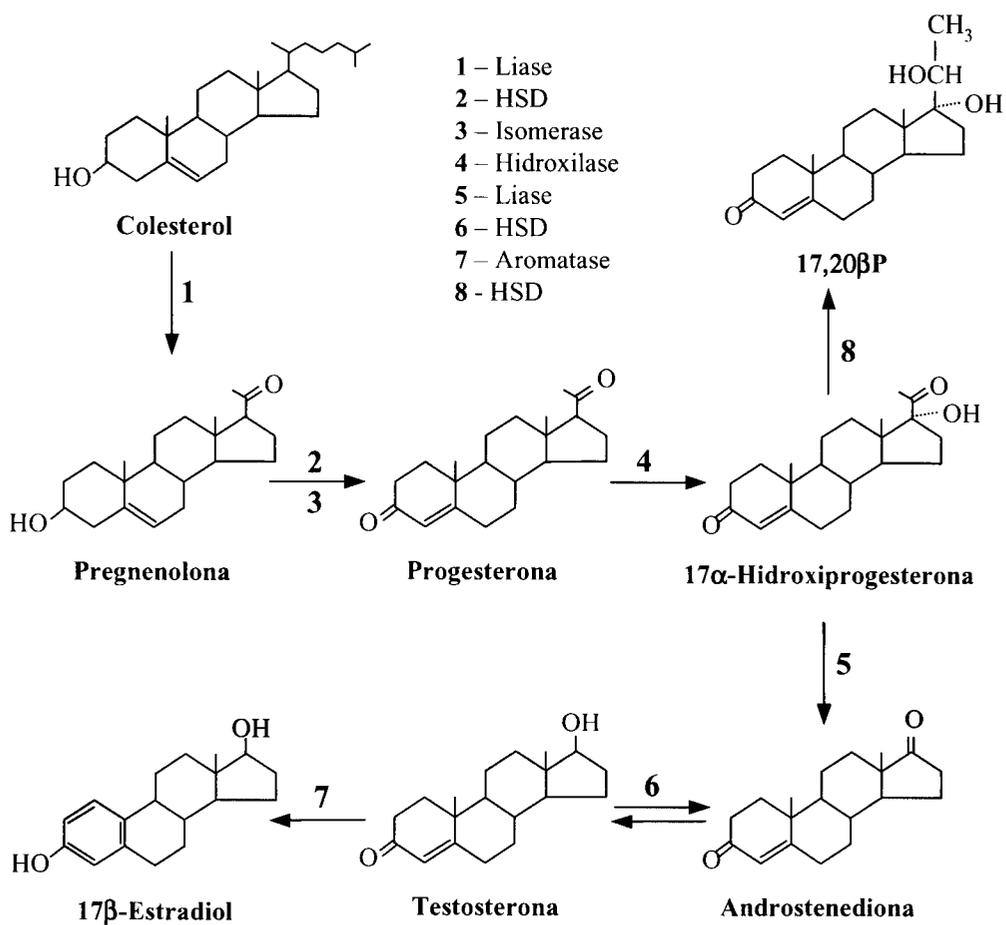
## 2. Hormonas esteróides

Os esteróides são sintetizados nas gónadas e têm um papel muito importante na diferenciação, desenvolvimento sexual, osmorregulação e metabolismo.

A biossíntese das hormonas esteróides está descrita para os mamíferos: o acetato é convertido em colesterol após um número elevado de reacções, e a partir do colesterol são então sintetizadas todas as hormonas esteróides através de desidrogenases e enzimas dependentes do citocromo P450, que catalisam reacções de hidroxilação e oxidação-redução. A localização celular das enzimas situa-se maioritariamente na mitocôndria e no retículo endoplasmático das células da gónada (Kime, 1987). A estrutura base de um

esteróide compreende quatro anéis, à qual pode ser adicionado oxigênio e diferentes substituintes de carbono em várias posições. A actividade biológica da hormona esteróide depende da sua estrutura e da ligação aos receptores, daí estes compostos possuem estruturas bastante estáveis.

Na figura 3 estão representados os principais esteróides envolvidos na reprodução dos teleosteos.



**Figura 3:** Representação esquemática da síntese de algumas hormonas esteróides.  
 HSD: hidroxisteróide desidrogenase .

## 2.1. Estrogénios e fase vitelogénica

Os estrogénios são esteróides em C18 e característicos pelo seu anel aromático. Nos teleósteos, tal como em outros vertebrados, o estrogénio mais activo é o E2, sendo o principal indutor da síntese de VTG no fígado. A estrona e o estriol, juntamente com o E2, actuam sobre a indução da formação das vesículas vitelinas no peixe dourado, *Carassius auratus*; no robalo, *Dicentrarchus labrax*, o estriol existe em quantidade elevada na mesma fase (Rocha, 1996). As fases iniciais da oogénese requerem a presença de gonadotropinas para iniciar a síntese de estrogénios, que por sua vez, estimulam a síntese de VTG e a sua captação pelos oócitos.

A vitelogénese nos teleósteos é promovida por um processo em duas fases, uma em que a GTH I estimula a secreção de E2 pelas células da granulosa, que por sua vez vai estimular a síntese e secreção de VTG pelo fígado; é responsável pelo crescimento do oócito em todos os peixes e a ela se deve cerca de 95% do peso final do oócito (Tyler *et al.*, 1991).

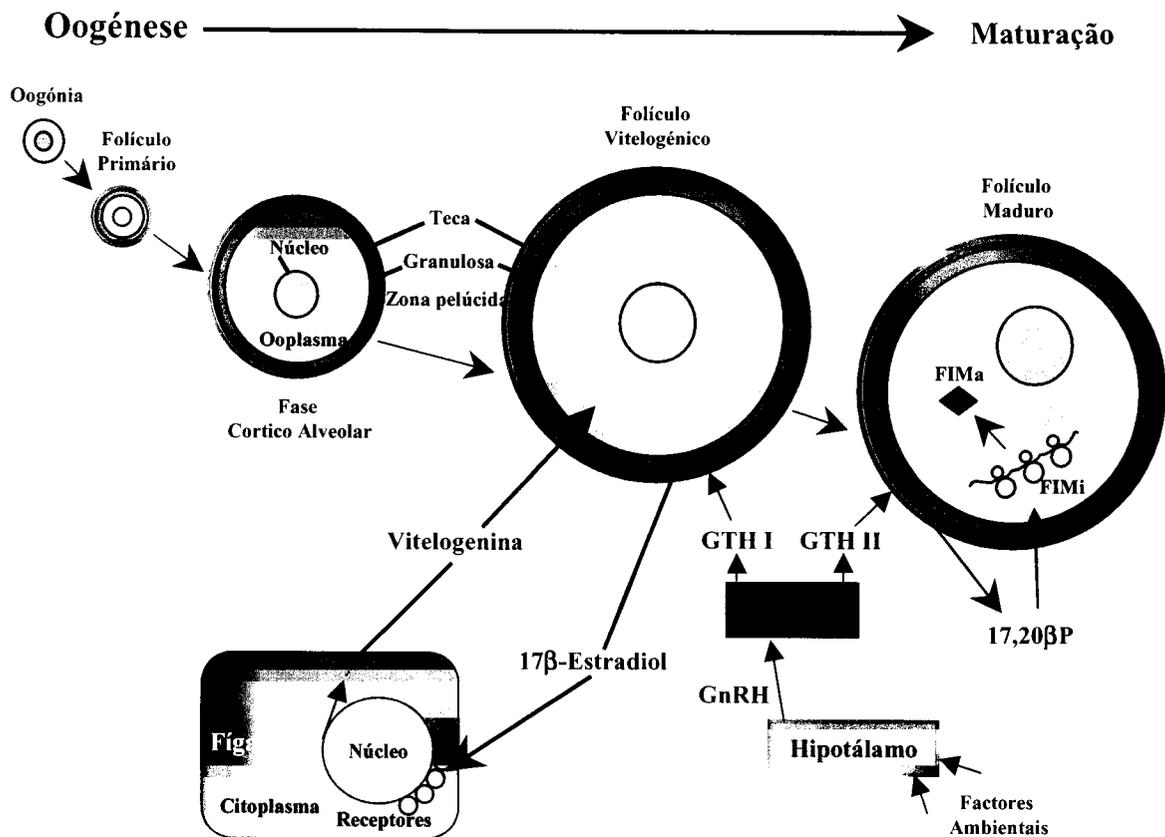
O E2 vai estimular a transcrição do gene da VTG no fígado e a síntese da proteína que vai ser incorporada pelos oócitos. A proteína atravessa as camadas foliculares em volta do oócito em crescimento, liga-se a um receptor específico altamente selectivo, localizado na superfície do oócito, e é então captada por um processo de endocitose (fig. 4). A VTG acumula-se em vesículas que migram em direcção ao núcleo e se fundem para formar uma massa contínua que confere aos oócitos uma transparência que lhes é característica.

A fase vitelogénica pode ser dividida em duas fases, a vitelogénese endógena e a exógena, atendendo à origem do vitelo, reservas produzidas no oócito ou incorporação de VTG (Tyler e Sumpter, 1996).

## 2.2. Progestagénios e maturação

Os progestagénios são esteróides em C21 que actuam na fase final da maturação imediatamente antes da ovulação. O  $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ( $17,20\beta$ P), é o esteróide com acção maturativa mais descrito em teleósteos, nas fases finais da maturação (Fostier, *et al.*, 1981; Scott *et al.*, 1982, 1983).

A maturação do oócito é regulada por três mediadores, nomeadamente: a gonadotropina, o esteróide indutor da maturação (EIM) e o factor indutor da maturação (FIM). Nos salmonídeos observou-se que o sinal que promove o início de todo o processo maturativo e ovulatório é a descida acentuada dos níveis plasmáticos de E2 (Young *et al.*, 1983), seguido da síntese de 17,20βP pela ligação de GTH aos receptores localizados nas células da granulosa e activação do sistema adenilciclase/AMPC, que leva à síntese de 20β-dihidroxiesteróide desidrogenase (20β-HSD), a enzima responsável pela conversão de 17α-hidroxiprogesterona (17P), produzida na teca, em 17,20βP na granulosa (fig. 4).



**Figura 4:** Esquema representativo do desenvolvimento dos oócitos. GnRH: Hormona Libertadora da Gonadotropina; GTH: Gonadotropina; FIMi: Factor Indutor da Maturação inactivo; FIMa: Factor Indutor da Maturação activo. Adaptado de Brooks *et al.*, 1997.

Na época da maturação a produção de androgénios e, principalmente de estrogénios, desce e os esteróides mais produzidos são os progestagénios, 17P e 17,20βP, podendo também nesta fase verificar-se um aumento de esteróides conjugados. O esteróide maturativo vai actuar no oócito activando o factor indutor da maturação, constituído por duas proteínas de baixo peso molecular, uma quinase e uma ciclina, pela síntese *de novo* da ciclina (Yoshikuni e Nagahama, 1991).

### 2.3. Androgénios

São esteróides em C19, tal como a testosterona e a 11-cetotestosterona. Enquanto que nos mamíferos a testosterona plasmática das fêmeas é inferior à dos machos, nos teleósteos pode ter valores superiores à dos machos. O papel da testosterona nas fêmeas ainda não é completamente claro, mas pode ter um papel muito importante na maturação do oócito (Kime, 1987).

### 3. Ácidos gordos no ovário

Os ácidos gordos (AG) estão ligados a processos fisiológicos e bioquímicos, assumindo grande importância para o funcionamento dos ecossistemas. Os AG que não são sintetizados pelos animais são considerados ácidos gordos essenciais (Essential Fatty Acids, EFA), e encontram-se muito conservados na cadeia alimentar aquática (Arts *et al.*, 2001). Os ácidos gordos podem ser agrupados em saturados e insaturados, de acordo com a presença de ligações duplas entre os átomos de carbono. Por sua vez, os insaturados podem ser subdivididos em MUFA (MonoUnsaturated Fatty Acids), ácidos gordos com apenas uma ligação dupla, e em PUFA (PolyUnsaturated Fatty Acids), ácidos gordos com duas ou mais ligações duplas. Para além do número de ligações duplas, podem também ser agrupados em três famílias, n-9, n-6 e n-3, designação relacionada com a posição da ligação dupla a contar do terminal metilo. Os AG saturados e os MUFA mais comuns (C16:1 e C18:1) podem ser sintetizados pela maioria dos animais, enquanto que os PUFA (ex: C18:2 e C18:3) são os únicos conservados pelos animais em todas os níveis tróficos, sendo componentes dos fosfolípidos das membranas, dos transmissores neurais, cruciais

para a visão, e no controlo do balanço iónico, incluindo o funcionamento das brânquias (Arts *et al.*, 2001). Os peixes possuem ácidos gordos de cadeia longa (mais de 20 átomos de carbono) e com cinco, ou mais, ligação duplas, que são denominados HUFA (HighlyUnsaturated Fatty Acids) sendo de salientar o ácido eicosapentaenóico (EPA), C20:5 n-3, e o ácido docosahexaenóico (DHA), C22:6 n-3. O DHA está localizado na posição central dos fosfolípidos, com grande parte do EPA e algum DHA em circulação sanguínea, especialmente após uma refeição (Arts *et al.*, 2001).

O teor em matéria gorda varia em função da espécie, da época do ano e da idade do animal. No próprio animal há locais em que a quantidade de lípidos é superior, existindo em maior quantidade na pele e na zona abdominal (Ackman, 1994).

As reservas de lípidos nos ovos de peixes são usadas para o desenvolvimento das larvas, como forma de reserva energética e como componente estrutural das membranas (Almansa *et al.*, 1999). O desenvolvimento embrionário e das larvas necessita de níveis elevados de HUFA n-3 (Rodriguez *et al.*, 1998).

Uma alimentação deficiente em ácidos gordos afecta a desova em truta arco-íris (*Oncorhynchus mikiss*), e tem grande importância na fisiologia reprodutiva (Watanabe, 1992). As fêmeas de truta com alimentação deficiente em ácidos gordos produzem ovos com pouca viabilidade, enquanto que com suplementos de HUFA n-3 a inviabilidade dos ovos diminui.

## Objectivos

Pouco se sabe acerca da reprodução de *Conger conger*. Para contribuir para o seu conhecimento, visamos responder a algumas questões relacionadas com esta fase, importante em qualquer espécie. Assim, o trabalho foi orientado para:

- Analisar morfológicamente o ovário e classificar, sob o ponto de vista histológico, as fases de desenvolvimento dos oócitos.
- Observar as variações de duas hormonas esteróides, T e E2, de acordo com o estado de desenvolvimento dos gâmetas.

- Observar a variação da proteína vitelogénica no sangue e relacionar com as fases de desenvolvimento dos oócitos.
- Avaliar a capacidade esteroidogénica dos folículos, doseando a T e o E2 produzidos *in vitro*.
- Quantificar os lípidos presentes no ovário e analisar os ácidos gordos presentes nesses lípidos.

## **Material e Métodos**

### **1. Material biológico**

As fêmeas adultas de congro foram capturadas na costa norte portuguesa (Vila Praia de Âncora) e espanhola (Vigo), e águas costeiras dos Açores, entre Fevereiro de 1999 e Março de 2000. Em Julho de 2000 efectuou-se uma amostragem na Ilha da Madeira (Funchal). A captura efectuou-se em barcos de pesca, a profundidades entre os 200 e os 600 m. Os animais foram medidos, do focinho à barbatana caudal, e pesados. O sangue foi recolhido, com seringa heparinizada, da veia caudal para tubos heparinizados, centrifugado a 130 g, durante 20 min, e recolheu-se o plasma, que foi conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até quantificação de hormonas esteróides e VTG. Um pequeno fragmento do ovário foi utilizado para análise morfológica, sendo o restante imediatamente colocado em azoto líquido para análise posterior.

### **2. Morfologia do ovário**

O tecido foi fixado em líquido de Bouin durante 24 h, desidratado em três banhos de etanol absoluto de concentrações crescentes e num banho de xilol. A inclusão, em parafina  $56^{\circ}\text{-}58^{\circ}$ , foi efectuada com moldes de Leuckart. Com um micrótomo efectuaram-se cortes de  $7\ \mu\text{m}$  de espessura, que foram corados com Hematoxilina de Mayer-Eosina (HE). Inicialmente foram analisados fragmentos com diferente localização no ovário. Como não se observaram diferenças optou-se por seccionar sempre uma porção do centro da gónada, esquerda ou direita. O diâmetro dos oócitos foi medido usando uma ocular calibrada de um microscópio invertido (Nikon), e o diâmetro médio calculado pela média de 100 oócitos medidos numa secção histológica.

### 3. Compostos químicos

A colagenase, específica para adipócitos, a tripsina, o meio de incubação Eagle's MEM, o meio Hank's Balanced Salt Solution, o HEPES e os esteróides de referência foram fornecidos pela Sigma. Os "kits" usados para dosar os esteróides foram da Diagnostic Products Corporation (DPC). Os restantes produtos químicos e solventes, todos de grau para análise (p.a.) foram obtidos da Merck.

### 4. Quantificação de esteróides plasmáticos

Os esteróides sexuais, testosterona (T) e 17 $\beta$ -estradiol (E2), foram quantificados, directamente do plasma, por radioimunoensaio (RIA) de fase sólida, usando "kits" da Diagnostic Products Corporation (DPC). Os anticorpos para os dois esteróides são extremamente específicos e têm reacções cruzadas muito baixas com outros esteróides endógenos. Os valores de algumas reacções cruzadas, segundo determinações da DPC são: anticorpo para a T (androstenediona 0,5%; 11 $\beta$ -hidroxitestosterona 0,8%; 11-cetotestosterona 16%; 5 $\alpha$ -dihidrottestosterona 3,3%; estrona 0,01%; E2 0,02% e cortisol 0,05%) e anticorpo para E2 (androstenediona ND; T 0,001%, 11-cetotestosterona 0,006%; 11 $\beta$ -hidroxitestosterona ND; estrona 10% e cortisol ND). A radiação gama do <sup>125</sup>I foi medida num contador MiniGamma 1275, da LKB – Wallac. Neste método o anticorpo específico para o esteróide a dosar encontra-se aderente à parede dos tubos de propileno em que é realizado o ensaio. Dentro do tubo é colocada a amostra, na quantidade especificada pelo "kit" (100  $\mu$ l para a T e 50  $\mu$ l para o E2), e a hormona marcada com o <sup>125</sup>I. Durante a incubação (3 h a 37°C para a T, e 3 h à temperatura ambiente para o E2) vai ocorrer competição entre o esteróide marcado e o esteróide plasmático, pelos locais de ligação ao anticorpo. Após o tempo de incubação verte-se o conteúdo dos tubos e a radiação gama é lida.

## 5. Quantificação da vitelogenina plasmática

A concentração plasmática da glicolipofosfoproteína, a vitelogenina, foi quantificada indirectamente através da determinação do fósforo inorgânico, porque há evidência que no plasma a VTG é a única proteína rica em fósforo (Tyler *et al.*, 1988). O fósforo inorgânico foi doseado pelo método colorimétrico segundo Reis-Henriques *et al.*, (1997).

As proteínas de 200 µl de plasma foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10 %, a 4°C durante a noite, seguido de centrifugação a 7 700 g, durante 10 min. O depósito foi ressuscitado em TCA a 5%, incubado a 90°C durante 30 min, e centrifugado nas condições descritas. O precipitado foi deslipidificado com os seguintes solventes orgânicos: etanol absoluto, clorofórmio:éter:etanol (1:2:2), acetona, e éter, centrifugando-se após cada um dos tratamentos a 12 000 g, durante 10 min. O resíduo final foi ressuscitado em 300 µl de uma solução de hidróxido de sódio 2 N, e incubado durante 10 min a 100°C, para libertação do Pi, sendo depois neutralizada com volume igual de ácido clorídrico 2 N. O doseamento colorimétrico foi feito após adição de um reagente de coloração preparado no momento com molibdato de amónio (5,72%, p/v) em ácido clorídrico 6 N, álcool polivinílico (2,32%, p/v) e verde de malaquite (0,082%, p/v). Deixou-se decorrer a reacção no escuro durante 60 min, sendo a absorvância lida num leitor de microplacas Multiskan MS da Labsystems, a 620 nm.

## 6. Lípidos e ácidos gordos do ovário

### 6.1. Extracção dos lípidos do ovário

Cerca de 1 g de ovário foi homogeneizado em 10 ml de diclorometano:metanol (2:1), e filtrado sob vácuo. O extracto bruto foi lavado com uma solução salina de cloreto de sódio 0,75%, para eliminar os compostos hidrossolúveis e dissociar as lipoproteínas (sendo eliminadas as proteínas). A fase orgânica foi recuperada passando por um filtro hidrofóbico e sulfato de sódio anidro, e evaporada num evaporador rotativo, com banho de

aquecimento a 50°C, sob vácuo, pesando-se, até peso constante, no final da evaporação os lípidos totais presentes.

## 6.2. Quantificação dos ácidos gordos

A metilação a frio dos ácidos gordos foi efectuada segundo a NP-974, (1986). Aos lípidos adicionou-se 2,5 ml de n-heptano e 0,5 ml de hidróxido de potássio 2 N em metanol. A mistura foi agitada e decantada após 20 min de repouso, para separar o glicerol dos ésteres metilados.

Os ésteres metílicos de 15 µl de amostra foram detectados num cromatógrafo gasoso HP 6890, da Hewlett Packard, modelo G1530, equipado com um detector de ionização por chama, a 290°C, e injector de split com uma razão 20:1, a 260°C. A separação foi efectuada com hélio como gás transportador, numa coluna capilar SUPELCO 2-4080C, SUPELCOWAX 10 (0,32 mm x 30 m). A temperatura da coluna foi programada para subir entre 180°C e 265°C durante 45 min, com incrementos de 1,8 °C/min. Os ésteres metílicos foram identificados por comparação com os tempos de retenção e área do pico, dos padrões de referência. A percentagem da área dos picos foi calculada recorrendo à utilização do software Hewlett Packard G 2070-60006 e G 2170-6006 acoplado ao cromatógrafo.

## 7. Incubação *in vitro* de ovário

O ovário de congro em fase mais avançada tem um grande número de células adiposas, aproximadamente 80 %. Com o objectivo de isolar os oócitos presentes no ovário das células adiposas, efectuou-se um tratamento prévio, durante 30 min, à temperatura ambiente, incubando o tecido quer com tripsina 0,25 % em Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), quer com colagenase específica para isolamento de adipócitos 1,0 mg/ml de HBSS, segundo método adaptado de Tung e Fritz (1998). O objectivo deste tratamento prévio era obter uma população mais rica em oócitos para se incubar, seguindo-se o tratamento com colagenase, nas restantes incubações.

Para este ensaio o tecido foi descongelado lentamente em soro fisiológico a frio, e depois de seco em papel de filtro, incubado, durante 30 min, à temperatura ambiente, numa solução de colagenase 1,0 mg /ml de HBSS. O tecido foi depois lavado em meio de incubação Eagle MEM (15 mM de HEPES e pH 7,4) e novamente seco em papel de filtro. Pesaram-se cerca de 2 g do tecido, depois da actuação da enzima, que se colocaram em frascos de incubação com 4,0 ml do mesmo meio e deixados a incubar à temperatura ambiente, durante a noite e com agitação, em três situações distintas:

1. Apenas com meio de incubação – situação **Controlo (C)**.
2. Incubação com 17 $\alpha$ -Hidroxiprogesterona (17P) como precursor exógeno na concentração de 25,0 ng/ml de meio de incubação– situação **17P**.
3. Incubação do tecido com precursor e com uma suspensão de hipófise de truta em vitelogenese, 5,0  $\mu$ g/ml meio de incubação – situação **Hipófise**.

No final da incubação os lípidos foram extraídos 3 vezes com 5 ml de éter dietílico. Após agitação, as fases orgânicas recolhidas foram reunidas e evaporadas a 30°C sob atmosfera de azoto. Ao extracto obtido foi adicionado 2,0 ml de metanol a 80% e, após agitação, os lípidos foram extraídos 3 vezes com 3,0 ml de éter de petróleo. Quer a fracção metanólica (contendo os esteróides), quer a fracção etérea (restantes lípidos) foram evaporadas a 50°C sob corrente de azoto. Os lípidos foram secos numa estufa a 60°C até peso constante. O extracto que continha os esteróides foi reservado a –20°C, para posterior doseamento de T e de E2.

## 8. Quantificação de esteróides produzidos *in vitro*

A T e o E2 foram quantificados por radioimunoensaio tal como descrito anteriormente. O extracto obtido após a deslipidificação foi dissolvido em tampão gelatina (tampão fosfato, pH = 7,4, com 0,05% de azida sódica, 0,9% de cloreto de sódio e 0,1% de gelatina) para que tivesse uma osmolaridade idêntica à do plasma (Reis-Henriques, *et al.*, 2000).

## **9. Análise estatística**

Os resultados são apresentados em gráficos e tabelas, e para cada grupo de resultados calculou-se o valor médio e o erro padrão da média.

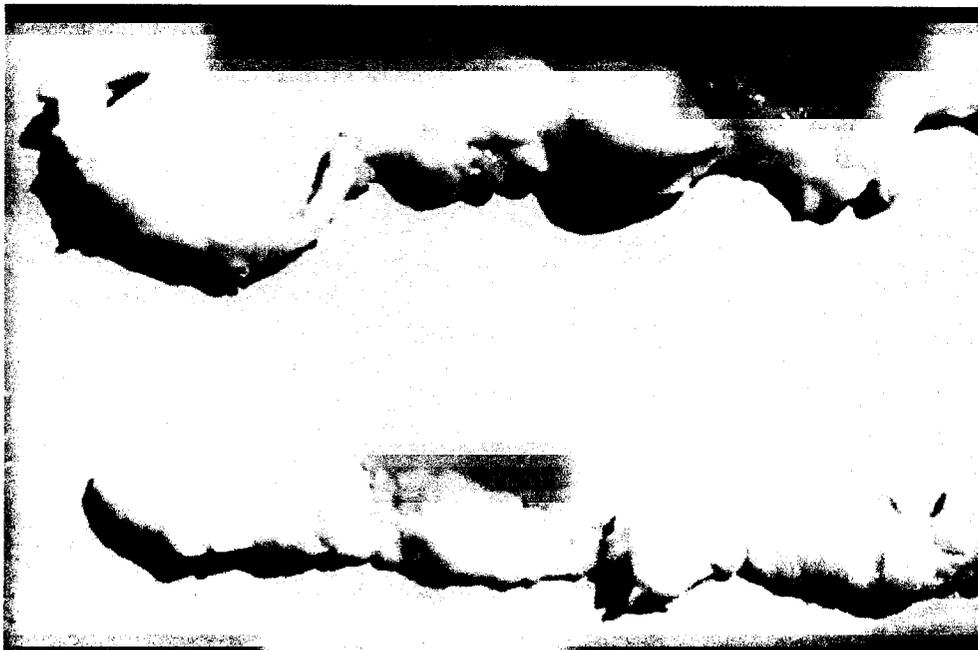
Para se estabelecerem as comparações estatísticas entre os resultados usou-se o teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Scheffé. Para esta análise usou-se o software Statistic 5.0 da Statsoft Inc.

## Resultados Obtidos

Neste estudo foram utilizados 24 espécimes de congro, com comprimentos entre 74,0 e 177,0 cm, peso entre 0,7 e 14,5 Kg, e IGS entre 0,2 e 5,9 %, não se tendo encontrado qualquer relação entre o peso, o comprimento e o IGS, com a época do ano ou local em que foram capturados.

### 1. Morfologia do ovário

Tal como foi descrito por Hood, *et al.*, (1988) para *C. oceanicus*, as gónadas de *C. conger* são estruturas planas e pregueadas, de cor branca estendendo-se para além do poro urogenital (fig. 5).



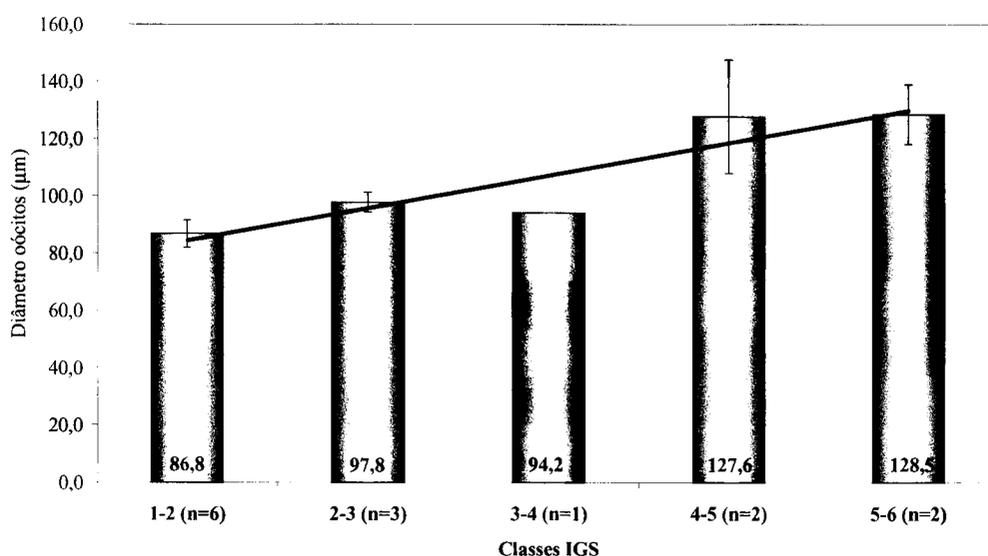
**Figura 5:** Ovário de congro. Fotografia cedida pela Dra. Mafalda Freitas, Estação de Biologia Marinha do Funchal, Madeira.

Apesar de não ter tido acesso directo a nenhuma fêmea madura, é possível apresentar um ovário mais desenvolvido onde se pode observar o aspecto granulado, que evidencia a presença de oócitos mais desenvolvidos (fig. 6).



**Figura 6:** Ovário de congro, mais desenvolvido. Fotografias cedidas pela Dra. Mafalda Freitas, Estação de Biologia Marinha do Funchal, Madeira.

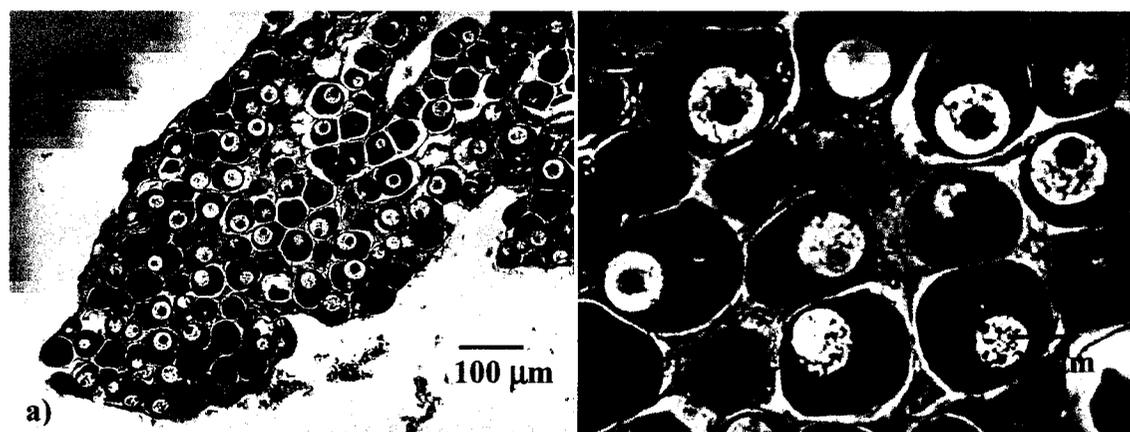
Pela análise morfológica dos ovários de várias fêmeas de congro verificamos que não foi encontrado nenhum animal maduro. As fêmeas com IGS mais baixo apresentavam oócitos com menor diâmetro. Os oócitos das fêmeas capturadas na Madeira apresentavam diâmetros superiores para o mesmo IGS, quando comparadas com as capturadas em Vigo. Não se encontrou qualquer relação entre a época do ano e o desenvolvimento do ovário.



**Figura 7:** Correlação entre o diâmetro médio dos oócitos e a classe de IGS.

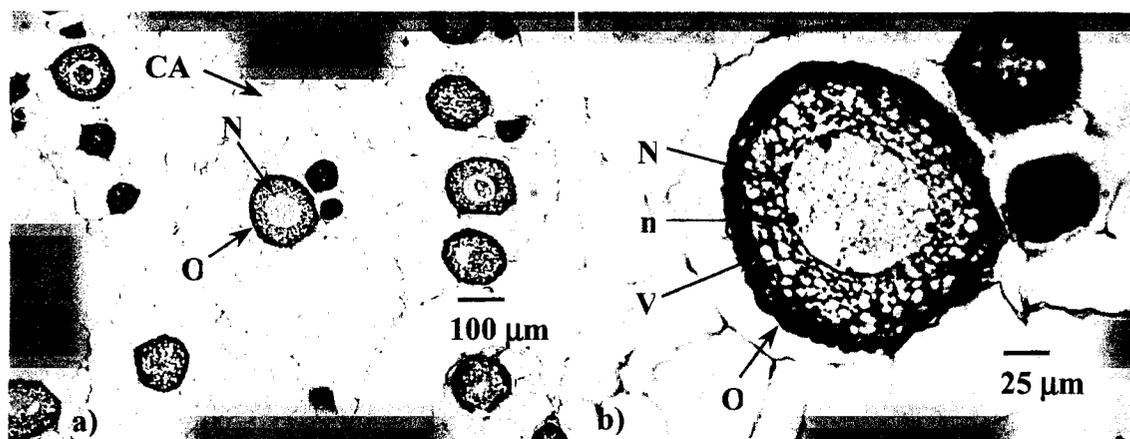
Na figura 7 estão representados apenas o diâmetro dos oócitos dos animais capturados em Vigo, observando-se uma correlação entre o IGS e o diâmetro dos oócitos ( $R^2=0,83$ ). O IGS não dá uma descrição conclusiva do desenvolvimento da gónada porque está fundamentalmente relacionado com a quantidade de células adiposas presente no tecido.

A observação histológica de ovários de fêmeas com  $IGS < 1\%$  revelou a presença de oócitos em crescimento primário empacotados no ovário, medindo entre 20 e 60  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Os oócitos apresentavam citoplasma basófilo com núcleo excêntrico, de grandes dimensões, e vários nucléolos distribuídos pelo nucleoplasma (fig. 8).



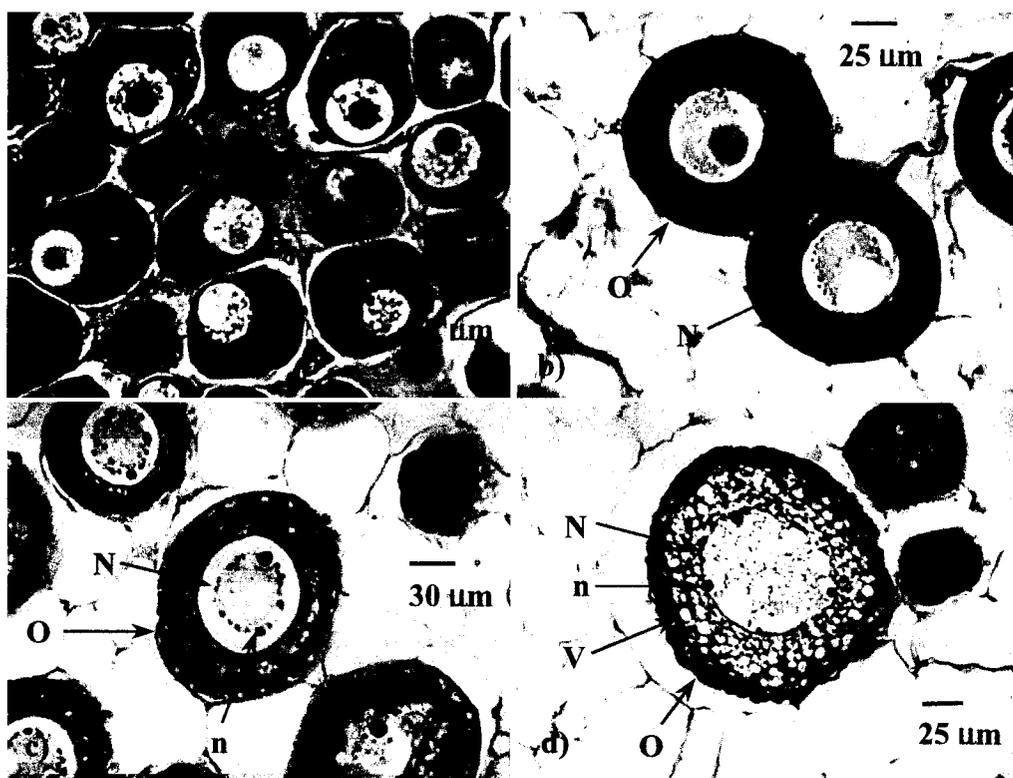
**Figura 8:** Secção de ovário de uma fêmea com  $IGS < 1\%$  apresentando oócitos em crescimento primário. Corte de 7  $\mu\text{m}$ . O=Oócito; N=Núcleo; n=Nucléolo. Ampliação: a) 100x e b) 400x.

Em fêmeas com  $IGS > 1\%$  o ovário apresentava grande número de células adiposas na zona central das pregas, enquanto que os oócitos em estado vitelogénico se encontravam localizados na periferia. Os oócitos mediam até 150  $\mu\text{m}$ , apresentando vesículas de gordura, que inicialmente se localizavam junto da membrana nuclear, indicando origem endógena, e que numa fase mais avançada se distribuíam por todo o citoplasma. O núcleo é central, com vários nucléolos na periferia do nucleoplasma (fig. 9).



**Figura 9:** Secção de ovário de uma fêmea com IGS>1% apresentando oócitos vitelogénicos. Corte de 7 µm. O=Oócito; N=Núcleo; n=Nucléolo; CA=Célula Adiposa; V=Vesícula. Ampliação: a) 100x e b) 400x

Adoptou-se fazer uma divisão em quatro fases, de acordo com a quantidade de vesículas distribuídas pelo citoplasma. A fase I foi caracterizada pela presença de oócitos primários, encontrando-se nas fêmeas com IGS<1%. As fases II, III, e IV em fêmeas com IGS>1% e oócitos vitelogénicos. A diferença entre estas três fases foi apenas registada pela quantidade e distribuição das vesículas pelo citoplasma do oócito (fig. 10). Como se pode observar na figura 10, na fase IV todo o citoplasma é ocupado pelas vesículas, o que corresponde aos oócitos de maior diâmetro.



**Figura 10:** Quatro fases de desenvolvimento dos oócitos de fêmeas de congro. a) Fase I; b) Fase II; c) Fase III e d) Fase IV. O=Oócito; N=Núcleo; n=Nucléolo; CA=Célula Adiposa; V=Vesícula. Ampliação: 400x.

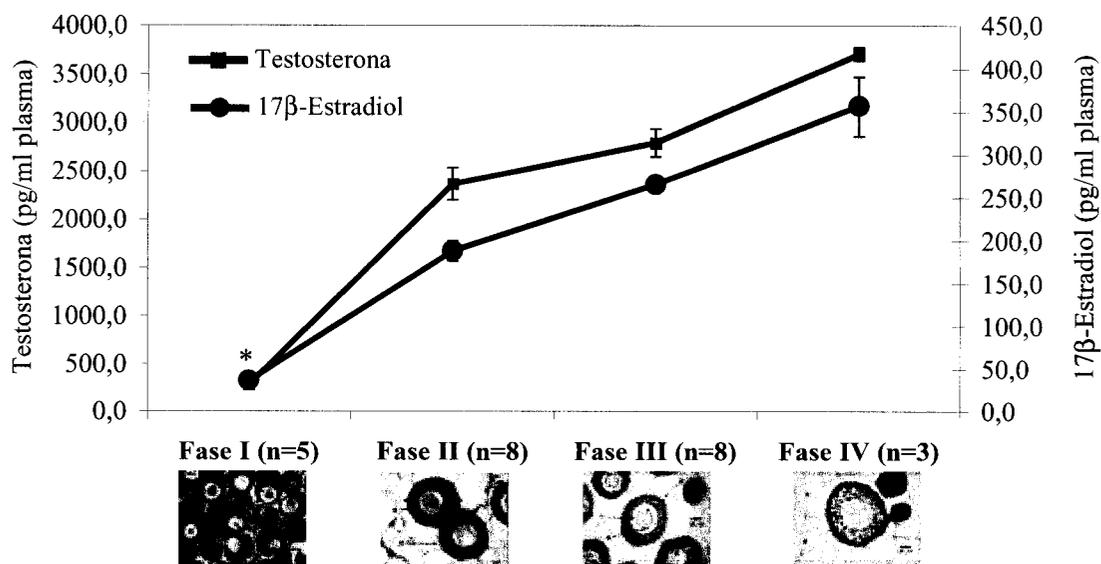
## 2. Níveis de vitelogenina plasmática

Os níveis de VTG encontrados no plasma das fêmeas variaram entre 8,57 e 10,20  $\mu\text{gPi/ml}$  plasma. Não sendo valores significativamente diferentes verificou-se no entanto, que os valores mais elevados correspondiam aos animais que apresentavam os oócitos num estado morfológico mais avançado.

## 3. Níveis de testosterona e 17 $\beta$ -estradiol plasmáticos

Os níveis de T no plasma variaram entre os 75,0 e 3968,6  $\text{pg/ml}$  de plasma, observando-se uma variação inferior para os níveis de E2, entre os 15,1 e 475,7  $\text{pg/ml}$  de

plasma. Para a T existe uma correlação sendo maior a quantidade de T circulante em animais com IGS superior ( $R^2=0,70$ ) e de maior comprimento ( $R^2=0,58$ ). Não se encontrando qualquer tipo de relação entre os níveis de E2 circulante com a época do ano, com o IGS ou com o comprimento do animal. A comparação da concentração no plasma destes dois esteróides com cada uma das fases atrás descritas mostra que existe uma correlação entre estes esteróides e o desenvolvimento dos oócitos. Assim, na fase menos avançada observou-se níveis mais baixos de T e de E2, sendo significativamente diferentes ( $p<0,05$ ) das outras fases, em que a concentração destes esteróides é superior (fig. 11).

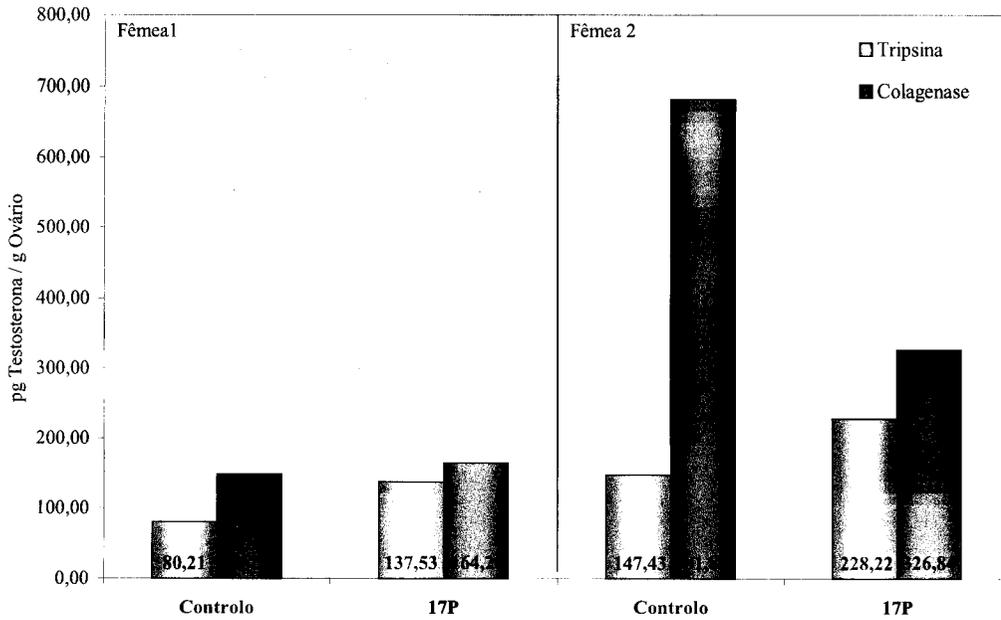


**Figura 11:** Níveis de T e de E2 de acordo com o desenvolvimento dos oócitos. Valores apresentados como Média±Erro Padrão. Diferenças estatísticas:\*)  $p<0,05$ .

#### 4. Esteroidogénese *in vitro*

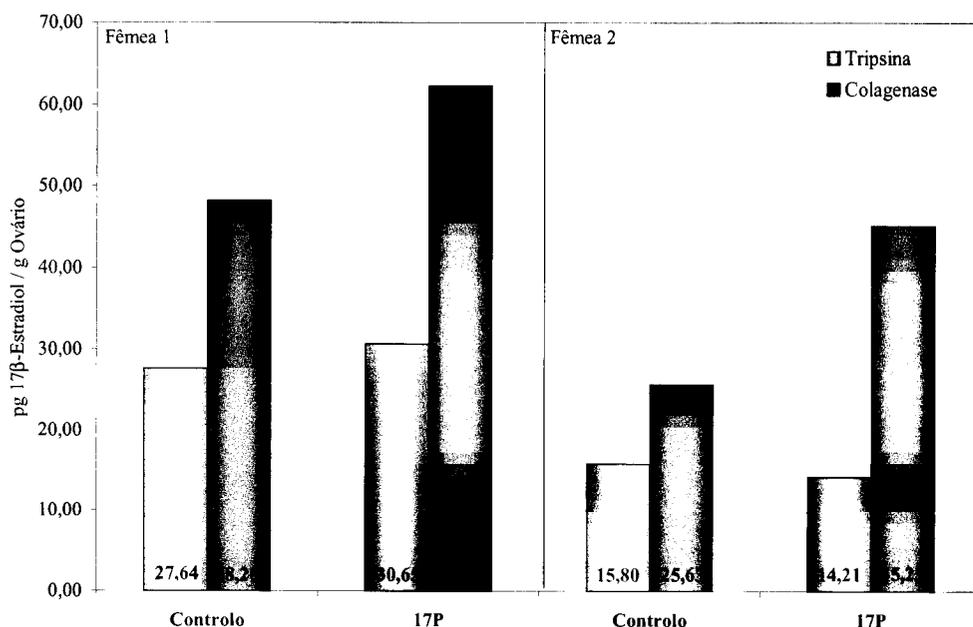
Os ensaios prévios efectuados para se estabelecer o melhor método para as incubações não foram conclusivos, porque os oócitos se encontravam aprisionados numa matriz de células adiposas.

Foram feitos ensaios em duplicado com ovários de fêmeas em estados próximos (fase III), com as duas enzimas, tripsina e colagenase, e os resultados mostraram que para a síntese de T, a colagenase teve uma acção mais eficaz (fig. 12).



**Figura 12:** Níveis de T produzida pelo ovário após acção com a tripsina e com a colagenase.

Para o E2 os resultados obtidos foram semelhantes, verificando-se uma maior produção deste esteróide quando a gónada foi tratada previamente com a colagenase (fig. 13).

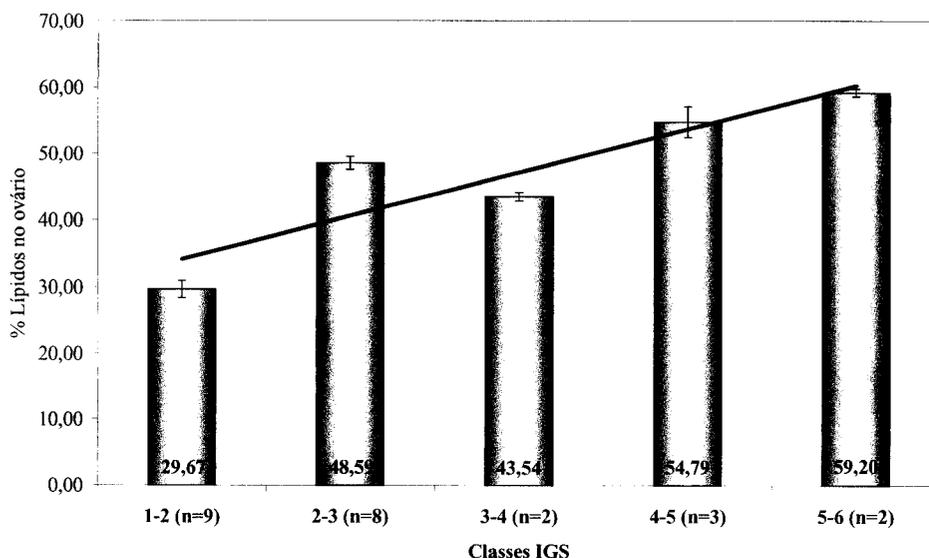


**Figura 13:** Níveis de E2 produzido pelo ovário após acção da tripsina e da collagenase.

Uma vez que a acção da collagenase mostrou ser mais eficaz, as incubações seguintes foram precedidas do tratamento com collagenase 1,0 mg/ml, durante 30 min.

Depois de estabelecidas as melhores condições de trabalho, analisou-se a produção de T e de E2 pelos oócitos de 15 fêmeas com IGS compreendidos entre 1 e 6 % provenientes de três locais de captura: Vila Praia D'Âncora, Vigo e Madeira.

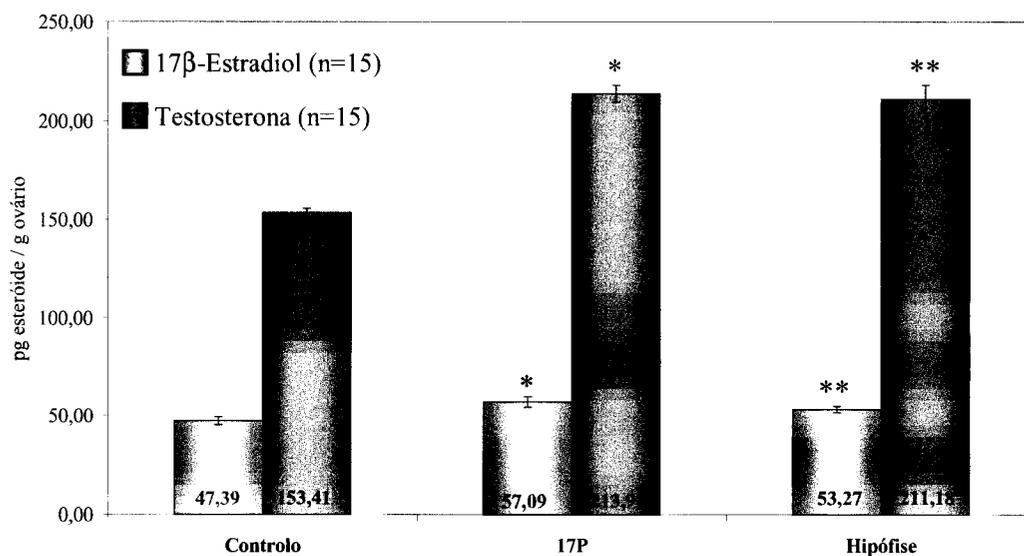
Como não foi possível obter uma fracção de oócitos isenta de células adiposas, calculou-se a percentagem de lípidos totais presente no ovário de cada um dos congros usados nas incubações. Os animais foram agrupados por classes de 1% de IGS, verificando-se que existe uma correlação positiva ( $R^2=0,81$ ) entre a percentagem de lípidos e as classes de IGS (fig. 14).



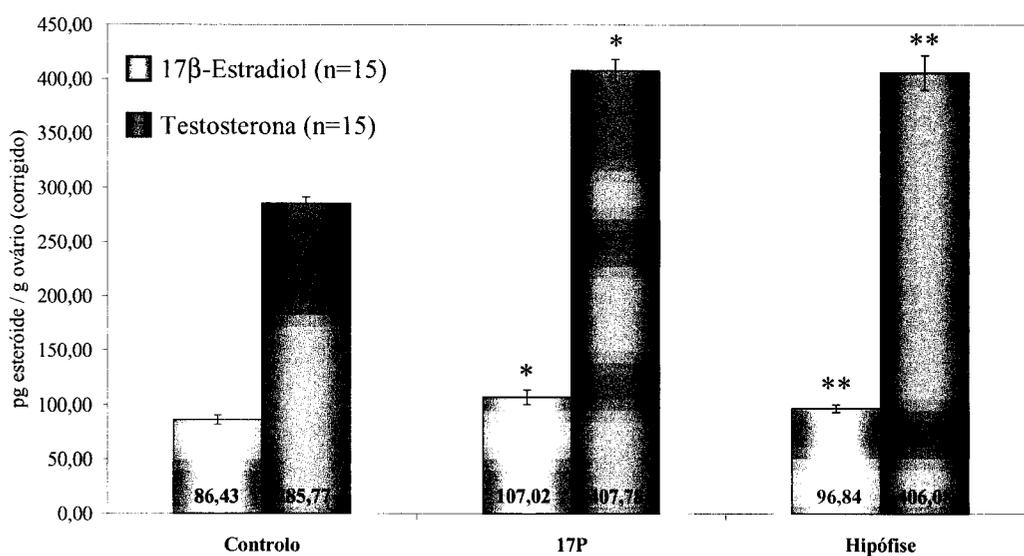
**Figura 14:** Correlação entre classes de IGS e percentagem de lípidos totais presentes no ovário.

A figura 15 mostra que ocorreu síntese de T e E2 nas três situações de incubação, embora seja superior na presença do precursor, e do precursor e hipófise. Pode observar-se ainda um aumento da síntese de esteróide quando se realiza a incubação na presença do precursor, sendo um pouco mais acentuado no caso da T, que passa de  $153,41 \pm 2,23$  pg/g de ovário para  $213,91 \pm 4,28$  pg/g de ovário na presença de 17P. Para o E2, o aumento é de  $47,39 \pm 1,95$  pg/g de ovário para  $57,09 \pm 2,76$  pg/g. Na presença de 17P e hipófise a síntese de T foi de  $211,18 \pm 6,98$  pg/g de ovário e para o E2 de  $53,27 \pm 1,69$  pg/g de ovário.

Como já foi referido o número de adipócitos é sempre superior ao número de oócitos presente. Para saber qual a sua influência no resultado final foi determinado o peso correspondente aos lípidos totais, que foi subtraído ao peso do tecido usado na incubação, e a produção de esteróides referida a esse valor. No entanto, como se pode observar na figura 16, as diferenças relativamente ao controlo são mantidas na mesma percentagem, embora os valores, como era de esperar, sejam mais elevados.



**Figura 15:** Níveis de T e de E2 produzidos pelo ovário. Diferenças estatísticas relativas ao controlo: \*)  $p < 0,05$ ; e \*\*)  $p < 0,01$ .

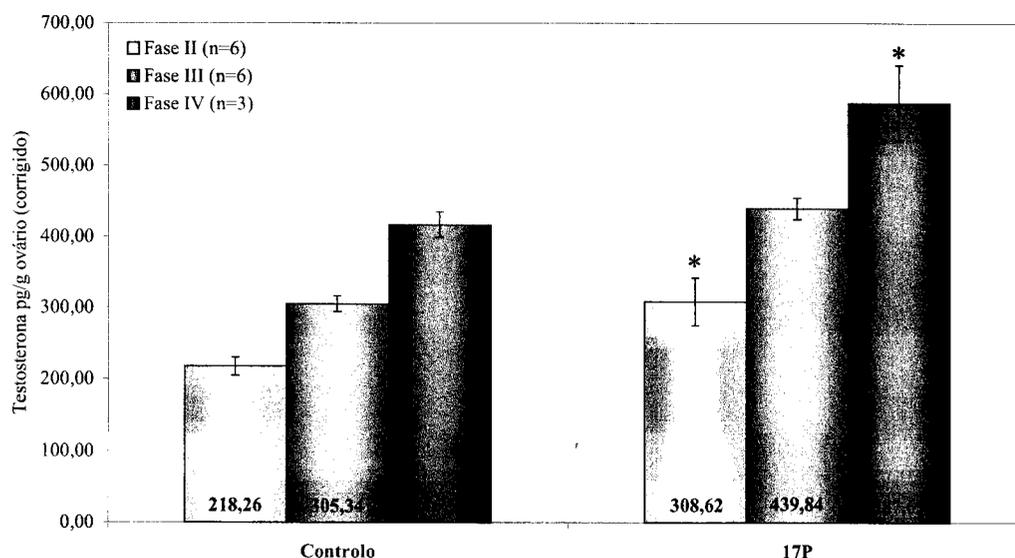


**Figura 16:** Níveis de T e de E2 produzidos pelo ovário, sem os lípidos totais do ovário. Diferenças estatísticas relativas ao controlo: \*)  $p < 0,05$ ; e \*\*)  $p < 0,01$ .

O aumento da síntese de T é de 29,9 % na situação com 17P e 29,6 % na incubação com suspensão de hipófise. Tal como acontecia com os lípidos presentes na gónada, verifica-se um aumento menor na situação em que está presente a suspensão de hipófise. Neste caso a tendência é a mesma, verificando-se que a síntese de E2 aumenta nas duas situações em que se incubou a gónada, 19,2 % para 17P e 10,7 % na presença de hipófise.

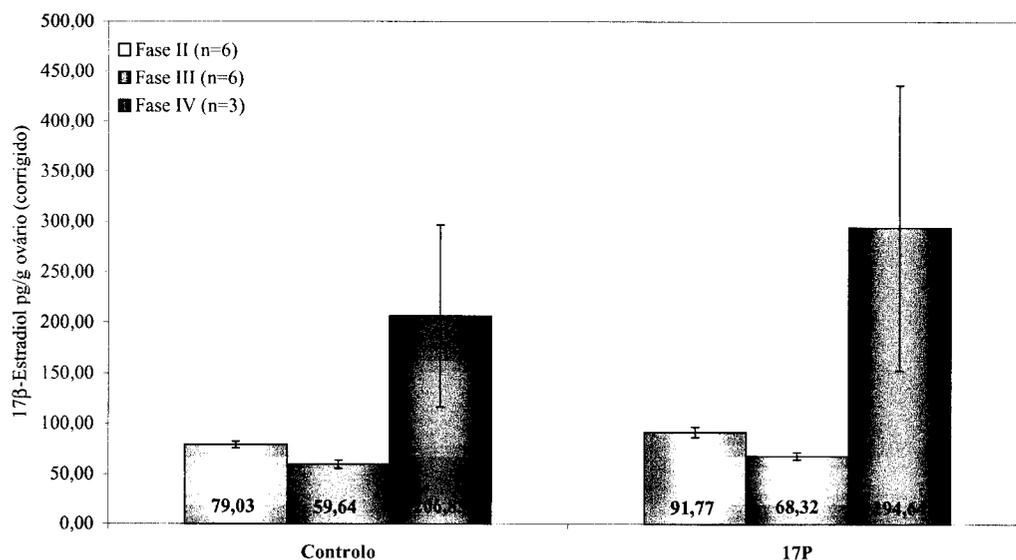
Para melhor análise da capacidade dos oócitos sintetizarem esteróides separam-se três fases, a fase II, III, e IV, de acordo com o critério já descrito. Não se utilizou gónada com oócitos na fase I porque os oócitos nesta fase não têm capacidade de síntese, e também porque o tamanho da gónada não o permitia.

Como mostra a figura 17 a síntese de T é superior nas fases de desenvolvimento mais avançadas (fase II  $218,26 \pm 13,02$  pg/g; fase III  $305,34 \pm 10,97$  pg/g e fase IV  $416,54 \pm 17,73$  pg/g), sendo ainda maior a síntese deste esteróide na presença de 17P em todas as fases (fase II  $308,62 \pm 33,28$  pg/g; fase III  $439,84 \pm 15,38$  pg/g e fase IV  $587,69 \pm 53,01$  pg/g). Os níveis de T obtidos nas três fases mostra que a produção na fase IV é sempre superior.



**Figura 17:** Níveis de T produzida pelo ovário em diferentes estados de desenvolvimento. Diferenças estatísticas relativas ao controlo: \*)  $p < 0,05$ .

Os níveis de E2 produzidos pelos oócitos nas diferentes fases são muito variáveis. Na figura 18 observa-se que na fase II ocorre um aumento da síntese (C  $79,03 \pm 3,43$  pg/g ; 17P  $91,77 \pm 5,39$  pg/g), na fase III a produção deste esteróide é mais baixa que na fase II e na fase IV apesar dos níveis serem aparentemente superiores, não são significativos devido ao número reduzidos de animais nesta fase.



**Figura 18:** Níveis de E2 produzido pelo ovário em diferentes estados de desenvolvimento.

## 5. Análise qualitativa dos ácidos gordos.

A extracção dos lípidos totais para análise dos ácidos gordos, foi efectuada de forma diferente da referida anteriormente para evitar a oxidação destes. No entanto, o rendimento da extracção é semelhante para os dois métodos. Extraíndo os lípidos totais de ovários de seis animais após incubação, com éter de petróleo, obteve-se uma quantidade de 61% de lípidos totais, enquanto que, com diclorometano:metanol, para os mesmos animais, a quantidade de lípidos totais foi de 60%.

Para a análise da qualidade dos ácidos gordos utilizaram-se ovários que apresentavam maior quantidade de células adiposas, correspondentes a estados mais

avançados da vitelogénese. A gordura da gónada apresenta o perfil de ácidos gordos descrito na tabela 1.

**Tabela 1:** Perfil de ácidos gordos dos lípidos presentes na gónada de fêmeas *C. conger*. Valores que representam a média de seis análises. Média  $\pm$  Erro Padrão.

Ácido Gordo	<i>C. conger</i> (%)	<i>C. cinereus</i> (%)*
C12:0	0,06 $\pm$ 0,00	Tr
C14:0	4,66 $\pm$ 0,07	4,5
C14:1	0,12 $\pm$ 0,01	0,2
C15:0	0,49 $\pm$ 0,01	0,5
<b>C16:0</b>	<b>16,3 <math>\pm</math> 0,22</b>	<b>23,4</b>
<b>C16:1</b>	<b>8,10 <math>\pm</math> 0,15</b>	<b>9,7</b>
C17:0	0,53 $\pm$ 0,01	0,5
C17:1	0,25 $\pm$ 0,01	-
C18:0	3,12 $\pm$ 0,07	4,1
<b>C18:1</b>	<b>23,6 <math>\pm</math> 0,47</b>	<b>35,0</b>
C18:2	1,20 $\pm$ 0,06	0,6
C18:3	0,79 $\pm$ 0,04	0,5
C20:0	0,19 $\pm$ 0,00	0,2
C20:1	2,34 $\pm$ 0,11	1,7
<b>C20:5</b>	<b>6,87 <math>\pm</math> 0,20</b>	<b>1,2</b>
C22:0	0,08 $\pm$ 0,00	0,1
C22:1	0,33 $\pm$ 0,01	0,7
<b>C22:6</b>	<b>11,3 <math>\pm</math> 0,20</b>	<b>7,0</b>

\* Ackman, 1991

Tr- Vestígios

De acordo com os resultados verifica-se que os ácidos gordos presentes em maior quantidade são C16:0, C16:1 e C18:1, ácidos gordos que podem ser sintetizados pelo animal, encontrando-se em menor quantidade que a descrita para *C. cinereus*. Os PUFA, C18:2 e C18:3, foram detectados em baixas quantidades, sendo no entanto, superiores às de *C. cinereus*. O EPA e o DHA, ácidos gordos altamente insaturados, encontram-se em maior quantidade (EPA 6,87  $\pm$  0,20 e DHA 11,3  $\pm$  0,20), que em *C. cinereus*.

## Discussão

Neste trabalho foi realizado o estudo do ciclo reprodutivo de fêmeas de congro (*Conger conger* L.), capturadas na costa portuguesa, em Vila Praia D'Âncora, Açores e Madeira, e na costa espanhola, em Vigo, não se tendo encontrando fêmeas maduras ou ovuladas. Este facto poderá confirmar a migração reprodutiva desta espécie para o Mar Mediterrâneo (Cau e Manconi, 1984), ou a desova a maior profundidade.

Não foi obtida nenhuma correlação positiva entre o IGS e a época do ano em que os animais foram capturados, mas apenas com o estado de desenvolvimento sexual e com a quantidade de células adiposas presentes no ovário.

Morfológicamente o ovário de congro é idêntico ao descrito por Hood *et al.* (1988) para *Conger oceanicus*, sendo constituído por duas estruturas planas, brancas e pregueadas que se estendem para além do poro urogenital o que, segundo Fishelson, (1994) liberta os outros órgãos do abdómen, principalmente o intestino, da pressão exercida pelas gónadas durante a reprodução.

As fases de desenvolvimento dos oócitos descritas para *C. oceanicus* (Hood *et al.*, 1988) e *C. myriaster* (Okamura *et al.*, 2000) são encontradas também nesta espécie. As fêmeas com IGS<1% de *C. conger* analisadas apresentavam oócitos com diâmetro entre 20 e 60 µm, enquanto que em *C. oceanicus* (Hood *et al.*, 1988) atingiam os 80 µm de diâmetro, com células em crescimento primário e com poucas células adiposas. Os oócitos em vitelogénese foram encontrados em fêmeas com IGS entre 1 e 6% medindo entre 80 e 150 µm de diâmetro, apresentavam grande quantidade de células adiposas que podem ocupar até 80 % do ovário; estas células adiposas foram descritas em *Anguilla anguilla* (Boetius e Boetius,1980) como tendo uma função de reserva energética para a migração reprodutiva.

As hormonas esteróides têm um papel importante na regulação endócrina da reprodução e estão relacionadas com o desenvolvimento dos oócitos. Neste estudo foram analisados os níveis plasmáticos de dois esteróides, a testosterona (T) e o 17β-estradiol (E2), sendo a T o que apresentou sempre os níveis mais elevados. Tal como aconteceu com o desenvolvimento do ovário, não se observou qualquer relação destes esteróides com a época do ano.

Níveis significativamente mais elevados ( $p < 0,05$ ) de T e E2 foram detectados com o aparecimento de vesículas lipídicas nos oócitos indicando activação do eixo hipófise-gónada, resultado também descrito em outras espécies de teleósteos (Scott, 1987; Injiri, *et al.*, 1995; Reis-Henriques, 1998), onde os níveis de T e E2 aumentam com o desenvolvimento do ovário. Os níveis de E2 nas fêmeas com IGS < 1% são da mesma ordem dos descritos para a *Anguilla japonica* (Ijiri *et al.*, 1995) e *Dicentrarchus labrax* (Rocha, 1996), com o mesmo desenvolvimento, enquanto que para a T os níveis são superiores no robalo e iguais aos medidos para a enguia japonesa.

Para IGS > 1% verificou-se que não existe correlação positiva com a produção de E2, explicando-se este facto pelo aumento do número de células adiposas que aparece nesta fase, o que demonstra que o IGS nesta espécie não é um indicador seguro do estado de desenvolvimento sexual.

A proteína vitelogénica, a vitelogenina (VTG), em circulação no sangue destes animais apresentou valores baixos e sem qualquer variação com o desenvolvimento sexual, demonstrando que o E2 circulante era insuficiente para estimular a síntese de VTG pelo fígado, resultado idêntico ao obtido em robalo, *Morone saxalitis* (Holland *et al.*, 2000). Os níveis de VTG variam entre os 8 e 10  $\mu\text{g/ml}$  de plasma, enquanto que em fase vitelogénica os teleósteos podem apresentar valores na ordem das centenas de  $\mu\text{g/ml}$  (Reis-Henriques *et al.*, 1997). Esta proteína apresenta uma relação directa com os níveis plasmáticos de E2 e T, e com a percentagem de oócitos vitelogénicos no ovário de várias espécies (Reis-Henriques *et al.*, 1997; Susca *et al.*, 2000).

De forma a avaliar a capacidade dos oócitos de *C. conger* sintetizarem os esteróides sexuais T e E2, efectuaram-se incubações de gónada *in vitro*. Em todas as preparações foi detectada a presença de T e E2, mostrando que a capacidade esteroidogénica se manteve, mesmo após congelação em azoto líquido e conservação a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A adição no meio de incubação, de um esteróide exógeno como precursor (17P) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a síntese de esteróides, observando-se um aumento de 29,9 % para a T e de 19,2 % para o E2, o que indica que a actividade da liase e da hidroxisteróide desidrogenase (HSD) é superior à actividade da aromatase.

Na incubação dos oócitos foi também adicionada uma suspensão de hipófise de truta vitelogénica, porque se sabe possuir uma quantidade elevada de GTH I (Tyler e Sumpter, 1996), que estimula a síntese de esteróides *in vitro* (Suzuki, *et al.*, 1988;

Yoshikuni e Nagahma, 1991). No entanto nesta situação não se verificou uma resposta à presença de GTH de truta. Este resultado pode ser explicado, em primeiro lugar, porque os receptores para a GTH de *C. conger* não reconhecem a GTH dos salmonídeos. Nesta espécie não foi ainda demonstrada a presença de qualquer gonadotropina, embora na enguia japonesa, *A. japonica*, tenham sido já caracterizadas a GTH I e GTH II, a primeira apresentando uma homologia maior com a FSH bovina do que com outras espécies de teleósteos, com excepção para o peixe-dourado (Yoshiura *et al.*, 1999). Em segundo lugar, as gónadas podem ter um período de insensibilidade à GTH mesmo depois de activada a sua capacidade esteroidogénica, tal como foi referido para a truta arco-íris (Fitzpatrick *et al.*, 1993). Testes realizados com folículos de *Anguilla dieffenbachii* deram resultados idênticos, não ocorrendo resposta à presença de GTH (Lokman e Young, 1995).

Como se verificou que o número de células adiposas aumentava com o desenvolvimento, foi efectuada a análise qualitativa dos lípidos, uma vez que são considerados de grande importância na alimentação, quer para o Homem, quer para os outros animais. Os ácidos gordos da família n-3 (HUFA n-3) presentes nos peixes podem prevenir e minimizar doenças cardíacas, ou outras condições patológicas, tendo os peixes vantagens nutricionais em detrimento de outra carne vermelha na alimentação humana (Bang e Dyerberg, 1985; Deadman, 1989). Estudos bioquímicos da composição de ovos e larvas de peixes marinhos apontam a importância dos HUFA n-3 como ácidos gordos essenciais (Izquierdo, 1996), e desempenhando um papel fundamental na reprodução, condicionando a qualidade dos ovos (Almansa *et al.*, 1999). Os AG presentes em maior quantidade no ovário de congro foram o C16:0, o C16:1 e o C18:1, tal como descrito para o *Conger cinerus* (Ackman *et al.*, 1991), e para a enguia europeia, onde estes são o principal constituinte dos lípidos de músculo (Dave *et al.*, 1974, 1976). Todos os PUFA n-3 (C18:2 e C18:3) presentes na alimentação são a fonte destes AG, que não são sintetizados *de novo* pelos peixes, tal como em todas as espécies animais estudadas até agora (Ruyter e Thomassen, 1999), variando, de acordo com a espécie, a capacidade de alongar e desnaturar os PUFA C18 em HUFA C20 e C22 (aos quais pertencem o EPA e o DHA) (Ruyter e Thomassen, 1999; Ruyter *et al.*, 2000), que poderá explicar o facto de *C. conger* possuir níveis mais elevados de EPA e DHA, como foi apresentado nos resultados. No entanto, a composição em ácidos gordos dos lípidos de congro, como espécie

carnívora, e, tal como outras espécies de anguiliformes, reflectem a sua alimentação (Otwell *et al.*, 1981/2; Sugii *et al.*, 1988).

No congro verificou-se que a quantidade de células adiposas no ovário aumenta com o desenvolvimento, podendo este facto estar relacionado não só com a migração reprodutiva, mas também com a qualidade dos ovos, e a sobrevivência das larvas.

## CAPÍTULO III – Indução da Maturação em Fêmeas de Congro, *Conger conger*

### Introdução

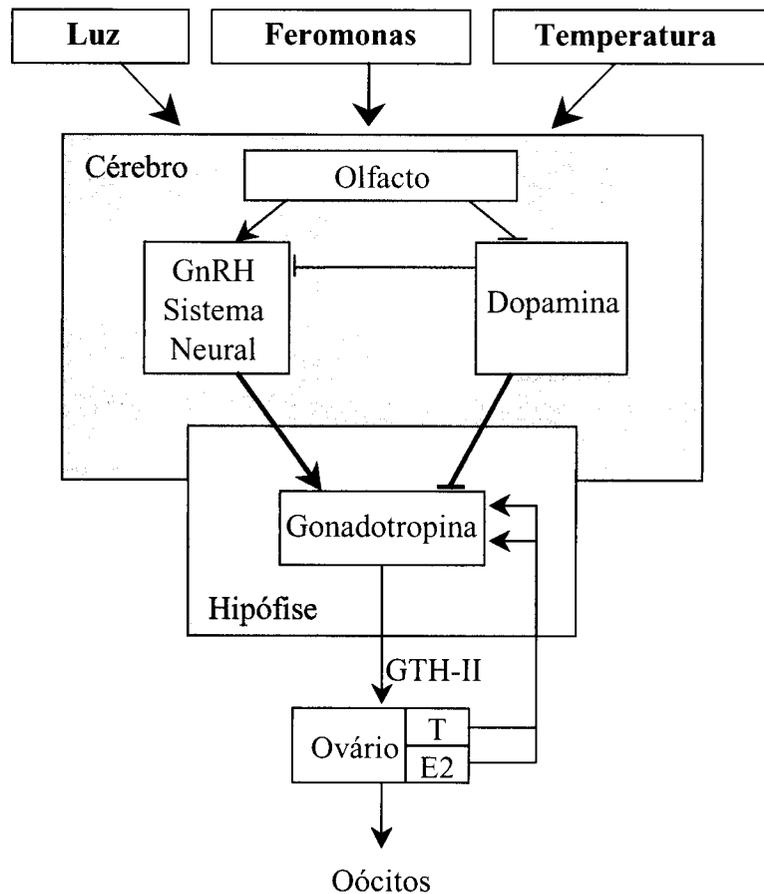
Nos teleósteos a maturação ocorre após um período de crescimento dos oócitos e precede a ovulação, sendo muito importante para uma fertilização bem sucedida. O oócito torna-se relativamente impermeável durante a maturação, e em alguns teleósteos a hidratação nas fases finais corresponde a um aumento considerável do tamanho final do oócito (cerca de 88%), que parece ser importante para a viabilização de ovos pelágicos (Tyler e Sumpter, 1996).

A hormona libertadora das gonadotropinas (GnRH) tem um papel regulador na secreção da gonadotropina maturativa (GTH-II) pela hipófise. A GnRH é um decapeptido, que nos salmonídeos é cerca de 80% similar com a hormona hipotalâmica humana. A estrutura básica desta proteína, identificada no cérebro de mamíferos, é pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sup>2</sup> (mGnRH). A primeira GnRH em peixes foi detectada no salmão (*Oncorhynchus keta*), com a seguinte diferença relativamente à humana [Trp<sup>7</sup>, Leu<sup>8</sup>]-GnRH (Sherwood *et al.*, 1994). Desde então, foram descritas outras formas em teleósteos, [His<sup>5</sup>, Trp<sup>7</sup>, Tyr<sup>8</sup>]-GnRH (GnRH de galinha ou cGnRH), mGnRH, [His<sup>5</sup>, Leu<sup>7</sup>, Asn<sup>8</sup>]-GnRH (GnRH de peixe gato ou cfGnRH), e [Ser<sup>8</sup>]-GnRH (GnRH de dourada ou sbGnRH) (Peter e Yu, 1997), podendo estar todas presentes na mesma espécie e com estrutura molecular bastante conservada, apresentando pequenas diferenças entre cada uma das formas.

Em alguns teleósteos, principalmente de água doce, para além do estímulo da GnRH na secreção e libertação da GTH pela hipófise, há uma inibição exercida pela dopamina (DA), quer na secreção de GTH a nível da hipófise, quer na libertação de GnRH pelo hipotálamo. A inibição do efeito dopaminérgico, juntamente com a estimulação da GnRH, constitui um mecanismo neuroendócrino importante que leva à síntese da GTH-II, necessário para a maturação e a ovulação.

A gonadotropina actua directamente no oócito, ligando-se a receptores específicos localizados na membrana, para induzir a síntese do esteróide indutor da maturação (EIM) pelas células da teca no folículo. Os esteróides descritos como maturativos são principalmente em C21, entre estes estão incluídos a progesterona, a 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17P), a 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregne-3-ona (17,20 $\beta$ P), a 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20 $\beta$ ,21P), o cortisol e a desoxicorticosterona (Yoshikuni e Nagahama, 1991). Em enguia japonesa, *Anguilla japonica*, Kagawa *et al.*, (1995) identificaram a 17P e 17,20 $\beta$ P, como indutores da maturação de oócitos *in vitro*. Contudo, estudos em vários teleósteos demonstraram que o EIM comum a um maior número de espécies é o 17,20 $\beta$ P (Nagahama *et al.*,1995).

O desenvolvimento dos oócitos só é possível pela acção dos factores externos como a temperatura, o fotoperíodo e os alimentos. Outros factores, que se pensa contribuir para a indução da maturação sexual e ovulação, são esteróides conjugados (sulfatos e glucorónidos) solúveis na água, cuja acção é sincronizar o desenvolvimento de machos e fêmeas da mesma espécie. A sincronização da maturação sexual deve-se à estimulação que estes compostos, denominados feromonas, exercem na libertação de GTH II (Sorensen e Stacey, 1991) (fig. 19).



**Figura 19:** Modelo de regulação neuroendócrina da secreção de GTH-II em fêmeas de peixe dourado. Adaptado de Peter *et al.*, 1997.

A reprodução de algumas espécies em cativeiro apresenta alguma dificuldade; as fêmeas, principalmente devido ao facto de não atingirem as fases finais da maturação, necessitam da administração de análogos da hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRHa) associada, ou não, a antagonistas dopaminérgicos, como o pimozide (PIM) ou domperidone (DOM) para atingirem a maturação. A administração em enguia japonesa, *Anguilla japonica*, de LHRHa e DOM aumentou os níveis de GTH na hipófise e no plasma (Lin *et al.*, 1990). Uma outra forma de se induzir a maturação é pela administração de extracto de hipófise de salmão (SPE), injeções repetidas deste extracto em *Anguilla japonica* induziram a vitelogénese (Ohta *et al.*, 1997). Outro tipo de hipofisação, também muito usado, consiste na administração de hormona coriónica humana (HCG)

apresentando, no entanto problemas de especificidade devido à diferença estrutural com a hormona dos teleósteos, podendo ocorrer reacções imunológicas após o uso prolongado desta hormona (Zanuy e Carrilho, 1987). Deste modo, são mais usados actualmente os análogos da hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRHa) associada, ou não, a antagonistas dopaminérgicos. A LHRHa, péptidos de síntese muito mais estáveis e activos, e resistentes à acção enzimática, com uma vida média mais longa, são activos num grande número de espécies, sem qualquer sinal de rejeição, não existindo problemas de especificidade para a libertação da gonadotropina (Reis-Henriques, 1998).

## Objectivos

Como todos os congros capturados se encontravam nos estados iniciais do seu desenvolvimento reprodutivo, alguns deles foram mantidos em cativeiro com a finalidade de se induzir a maturação por intermédio de tratamento hormonal. Assim, os objectivos deste estudo foram:

- Manter os animais em cativeiro e induzir a maturação com LHRHa associado ao PIM e a 17P.
- Observar as diferenças no desenvolvimento sexual destes animais comparando com os selvagens.
- Observar a variação de T e de E2 no sangue após a administração da hormona, e procurar a presença do esteróide maturativo, 17,20 $\beta$ P.
- Dosear a proteína vitelogénica no sangue após administração da LHRHa.
- Dosear os esteróides A, T, E2 e 17,20 $\beta$ P produzidos *in vitro* pelos folículos do animal tratado com LHRHa.

## Material e Métodos

### 1. Material biológico

Nesta experiência foram estudados dois animais com pesos de 8 Kg (congro 1) e de 13 Kg (congro 2), capturados em Vila Praia D'Âncora que se assumiram ser fêmeas, pelo peso elevado que apresentavam. Os animais foram mantidos em tanques com 8 m de diâmetro e cerca de 80 cm de altura de água, com circulação da água em circuito aberto, sendo a sua alimentação composta de sardinha e cavala.

### 2. Indução da maturação sexual com LHRHa e PIM.

Para induzir a maturação em fêmeas de *Conger conger* efectuaram-se injeções intraperitoneais de [D-ALA<sup>6</sup>]-hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRHa), Pimozide (PIM) e 17 $\alpha$ -hidroprogesterona (17P). O veículo usado foi uma mistura de óleo de coco:óleo vegetal (1:1, p/p). Antes do manuseamento, os animais foram anestesiados com 0,2 % de 2-fenoxietanol.

No congro 1 efectuou-se uma única injeção com 0,1mg LHRHa/g de Peso Corporal (PC), 10mg PIM/g de PC e 2 mg 17P/g de PC. O sangue foi recolhido da veia caudal para tubos heparinizados e centrifugado a 130 g, durante 20 min, e o plasma conservado a -80°C, até quantificação de hormonas esteróides e VTG. A fêmea foi sacrificada, após 15 dias com uma dose elevada de anestésico (2-fenoxietanol, 1ml/l), efectuando-se previamente uma colheita de sangue. As gónadas foram colocadas em azoto líquido e conservadas a -80°C até serem analisadas, e uma pequena porção foi fixada em líquido de Bouin para análise morfológica.

O congro 2 foi injectado 6 vezes, de 15 em 15 dias, com a mesma dose. Na última injeção a 17P foi substituída por 17 $\beta$ -estradiol (E2) na mesma concentração. Deste animal recolheu-se apenas sangue, aquando de cada uma das injeções, e ainda uma última colheita 2 semanas após a última injeção.

### 3. Morfologia do ovário

O tecido do congro 2 foi fixado, desidratado e incluído tal como descrito no capítulo II (pág. 14).

### 4. Compostos químicos

A [D-ALA<sup>6</sup>]-hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRHa), o pimozide (PIM), a 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17P) e o óleo de coco foram obtidos na Sigma. Todos os outros compostos químicos foram referidos no capítulo II (pág. 15).

### 5. Quantificação de esteróides plasmáticos

Os esteróides sexuais T e E2 foram quantificados directamente do plasma, por radioimunoensaio (RIA) de fase sólida, usando “kits” da Diagnostic Products Corporation (DPC), segundo o método descrito no capítulo II (pág. 15).

Os esteróides Androstenediona (A), 17P e 17,20 $\beta$ P foram identificados por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC). Foi usada uma coluna de fase reversa Nova-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> da Waters (3,9 mm x 100 mm), de grande estabilidade. Este sistema, equipado com um detector diode-array (Varian 9065 Polichrom), permitiu detectar substâncias que absorvem em comprimentos de onda, compreendidos entre 190 e 367 nm. A comparação entre os espectros e os tempos de retenção (Tr) das amostras padrão com os dos compostos em análise tornou possível a identificação e doseamento dos esteróides.

Os esteróides plasmáticos foram extraídos de 1 ml de plasma com 3x4 ml de éter dietílico. As fases etéreas recolhidas foram reunidas e evaporadas a 30°C, sob atmosfera de azoto. O extracto foi ressuscitado em 50  $\mu$ l de etanol filtrado, por um filtro de poro 0,20  $\mu$ m.

No método I os esteróides de 10  $\mu$ l de amostra foram eluídos com um gradiente de eluição com água:acetonitrilo. O acetonitrilo aumentou de 35% a 45% durante 15 min a

um fluxo de 0,75 ml/min. Picos com o mesmo espectro e Tr que os padrões, 17,20 $\beta$ P (9,1 min), T (9,7 min), A (11,9 min) e 17P (12,3 min) foram quantificados usando o software Varian 9065 acoplado ao cromatógrafo.

O método foi validado recolhendo do método I as fracções que se presumiu conterem 17,20 $\beta$ P (8,5-9,5 min), T (9,5-10,5 min), A (11,5-12,1 min) e 17P (12,1-12,5 min), sendo cada fracção evaporada em banho seco, a 50°C, sob corrente de azoto.

Cada extracto foi ressuspendido em 50  $\mu$ l de etanol e colocado numa placa de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (10 x 20 cm) da Merck, para Cromatografia de Camada Fina (TLC). Na mesma placa de TLC também foi colocada 50  $\mu$ l de uma mistura dos quatro padrões de esteróides. A placa foi desenvolvida num sistema de clorofórmio:metanol (95:5), e as manchas identificadas sob lâmpada de UV a 254 nm. A sílica foi raspada e colocada num colector de amostras de TLC, lavada com clorofórmio, e filtrada. O clorofórmio foi evaporado a 40°C em corrente de azoto, e o extracto obtido dissolvido em 50  $\mu$ l de etanol, para ser analisado num sistema de diferentes solventes no HPLC.

No método II o gradiente de eluição foi composto de metanol:água, começando com 48% de metanol e terminando com 100% após 30 min. O fluxo foi de 0,75 ml/min até aos 15 min e 1 ml/min até ao final do método. Neste sistema, os esteróides de 10  $\mu$ l de amostra foram eluídos em Tr diferentes, a A aos 13,4 min, a T aos 15,4 min, a 17P aos 16,5 min e a 17,20 $\beta$ P aos 17,1 min. Os esteróides foram quantificados por comparação dos espectros e respectivos Tr com as amostras padrão.

## **6. Quantificação da vitelogenina plasmática**

Os níveis plasmáticos de VTG foram quantificados pelo método indirecto de doseamento do fósforo inorgânico descrito no capítulo II, pág. 16.

## **7. Incubação *in vitro* de ovário**

A gónada do congro 1 foi utilizada para se avaliar a capacidade dos seus oócitos sintetizarem esteróides *in vitro*. O método utilizado foi o mesmo, e encontra-se descrito no capítulo anterior. No entanto, nestas incubações parte do extracto foi utilizada para quantificação de E2 e T, enquanto que outra parte do extracto obtido foi utilizado para quantificação de A, 17P e 17,20βP por HPLC.

## **8. Quantificação de esteróides produzidos *in vitro***

Os níveis de T e E2 foram quantificados por RIA de fase sólida, usando “kits” da DPC específicos para cada um deles, tal como foi descrito. O extracto final obtido após a deslipidificação foi dissolvido em tampão gelatina (tampão fosfato, pH = 7,0, com 0,05% de azida sódica, 0,9% de cloreto de sódio e 0,1% de gelatina). A radiação gama lida num contador MiniGamma 1275 da LKB-Wallac. O extracto obtido para a quantificação de A, 17P e 17,20βP foi ressuspenso em 50 µl de etanol filtrado, até doseamento por HPLC.

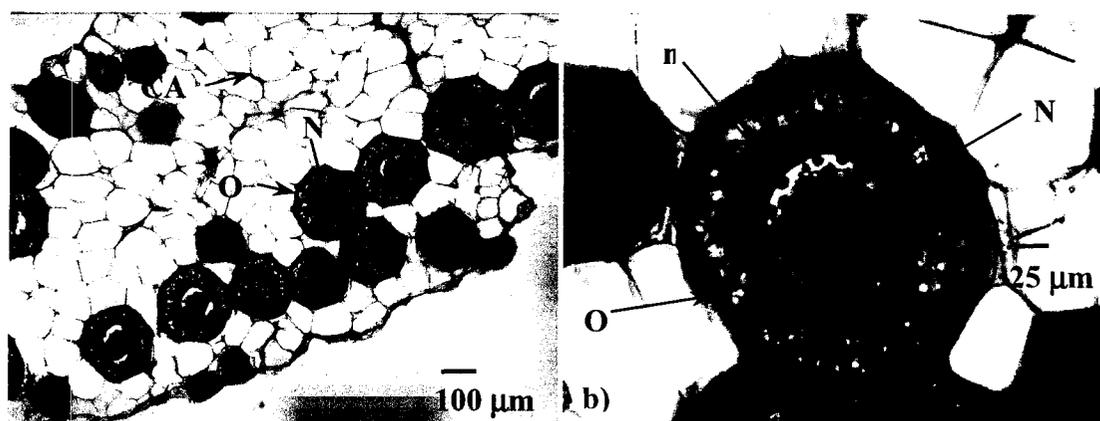
## **9. Análise estatística**

Os resultados são apresentados em gráficos e tabelas, e para cada grupo de resultados calculou-se o valor médio e o erro padrão da média.

## Resultados Obtidos

### 1. Morfologia do ovário

A morfologia do ovário do congro 1 foi semelhante à descrita para os animais selvagens com IGS>1%, apresentando uma matriz de células adiposas, oócitos com vesículas lipídicas dispersas por todo o citoplasma e diâmetro médio de 230  $\mu\text{m}$  (fig. 20).



**Figura 20:** Secção de ovário de fêmea injectada com LHRHa, PIM e 17P. O-oócito; CA-célula adiposa; N-núcleo; n-nucléolo. Ampliação: a) 100x e b) 400x.

### 2. Níveis de esteróides plasmáticos

A T e o E2 foram doseados, por RIA, no plasma dos dois animais usados nesta experiência, e encontram-se apresentados na tabela 2.

O congro 1 no tempo zero apresentava 10,94 ng/ml plasma de T e 282,9 pg/ml de plasma de E2, verificando-se um aumento de 8,3 % para a T e de 7,4 % para o E2. O congro 2, antes da administração de LHRHa associada ao PIM, tinha níveis de T e de E2 inferiores ao congro 1 (5,25 ng T/ml plasma e 146,58 pg E2/ml plasma). Aos 60 dias observaram-se os níveis mais elevados de T e de E2 com uma descida dos níveis aos 75 dias.

**Tabela 2:** Quantidade de T e de E2 plasmático e aumento entre cada dose verificados nos congros 1 e 2.

Congro	Tempo (dias)	T ng/ml plasma	Aumento (%)	E2 pg/ml plasma	Aumento (%)
<b>1</b>	0	10,94		282,9	
	15	11,85	<b>8,3</b>	303,84	<b>7,4</b>
<b>2</b>	0	5,25		146,58	
	15	7,66	<b>31,45</b>	211,82	<b>30,80</b>
	30	8,22	<b>36,11</b>	236,01	<b>37,89</b>
	45	12,32	<b>57,36</b>	333,47	<b>56,04</b>
	60	14,63	<b>64,10</b>	385,93	<b>62,02</b>
	75	10,72	<b>51,03</b>	318,53	<b>54,00</b>

Na figura 21 está representado o cromatograma a 254 nm da separação dos quatro esteróides 17P, A, T e 17,20 $\beta$ P feita pelo método I; e na figura 22 o cromatograma a 254 nm da separação dos mesmos esteróides separados método II, a partir dos quais se tentou detectar a presença do esteróide maturativo, 17,20 $\beta$ P, no plasma dos congros 1 e 2.

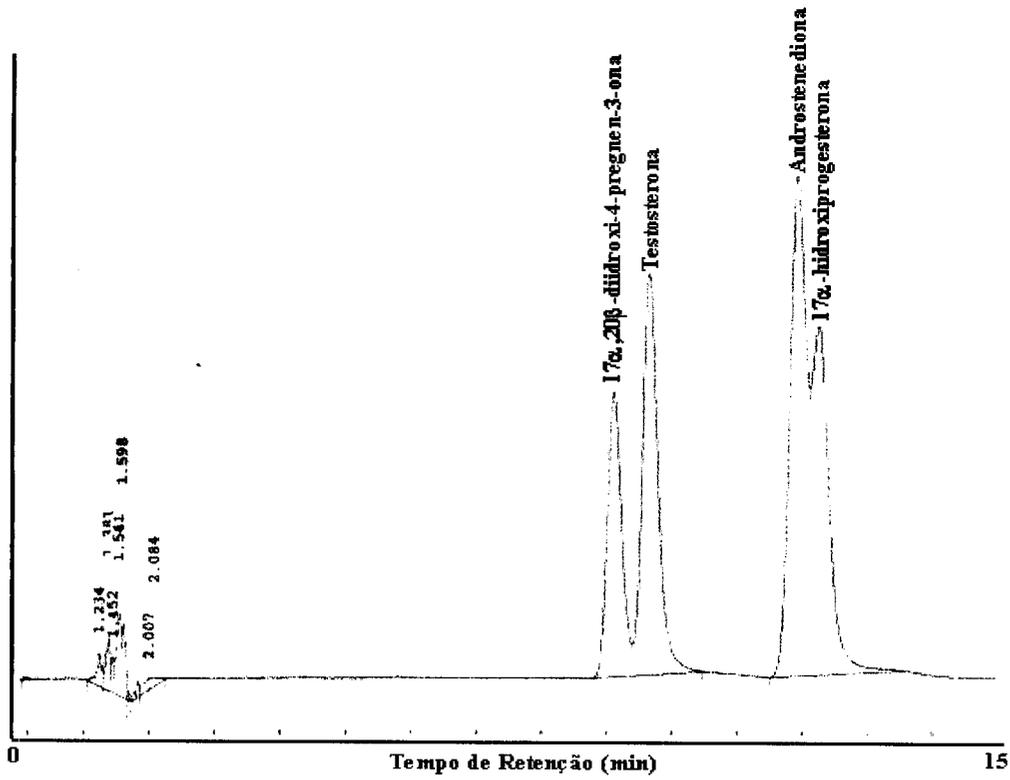


Figura 21: Cromatograma a 254 nm da separação dos quatro esteróides padrão (17P, A, T e 17,20βP) feita pelo método I com acetonitrilo:água como eluente.

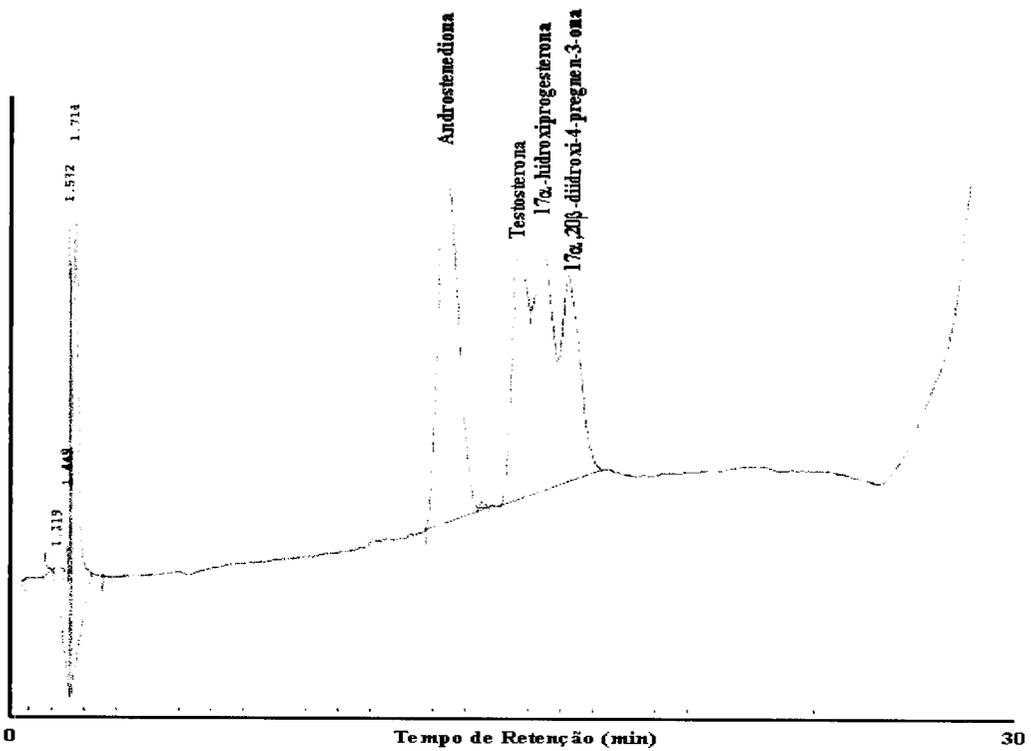


Figura 22: Cromatograma a 254 nm da separação dos quatro esteróides padrão (17P, A, T e 17,20βP) feita pelo método II com metanol:água como eluente.

No plasma do congro 1, por HPLC, e usando os dois sistema de eluição, foi possível detectar, a presença de A, antes (<1 ng/ml plasma) e depois (>1 ng/ml plasma), da administração de LHRHa associada ao PIM. O esteróide maturativo 17,20βP não foi detectado nem a partir do método I, nem do método II.

Nas tabelas 3 e 4 estão representados os esteróides detectados no plasma do congro 2 em cada uma das colheitas, pelo método I e método II de HPLC, respectivamente.

**Tabela 3:** Esteróides detectados e recolhidos no método I de HPLC. (ND) não detectado; (-) sem amostra; (+) níveis inferiores a 1 ng/ml plasma; (++) níveis superiores a 1 ng/ml de plasma.

Dias	0	15	30	45	60	75
A	+	++	++	++	-	++
17P	+	++	++	++	-	++
17,20βP	+	+	+	+	-	ND

**Tabela 4:** Esteróides detectados no método II de HPLC, após TLC. (ND) não detectado; (-) sem amostra; (+) níveis inferiores a 1 ng/ml de plasma; (++) níveis superiores a 1 ng/ml de plasma.

Dias	0	15	30	45	60	75
A	+	++	++	++	-	++
17P	+	++	++	++	-	++
17,20βP	ND	ND	ND	ND	-	ND

As tabelas 3 e 4 mostram que o congro 2 tinha níveis de A superiores a 1 ng/ml plasma, com resultados idênticos para a 17P. O 17,20βP foi detectado em níveis inferiores a 1 ng/ml plasma pelo método I, não sendo detectado pelo método II, após TLC (fig 23 e 24). Como é possível observar nas figuras 23 e 24 a A é detectada em ambos os metodos de HPLC, enquanto que o 17,20βP só é detectado no método I.

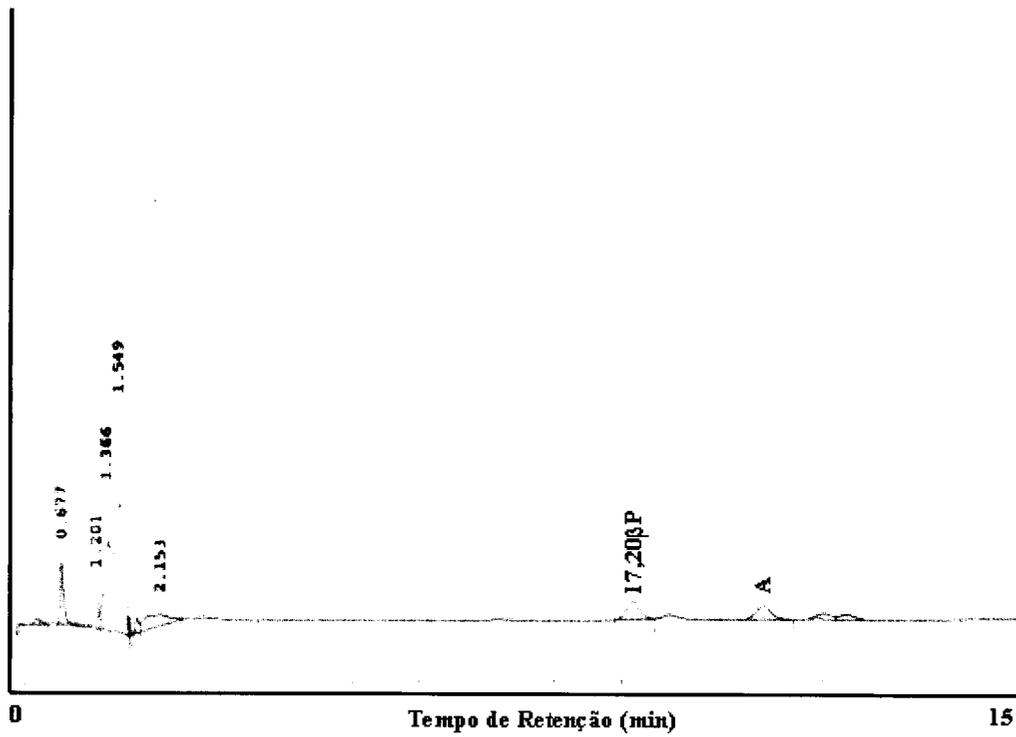


Figura 23: Cromatograma a 254 nm da separação de extracto de plasma de congro pelo método I de HPLC.

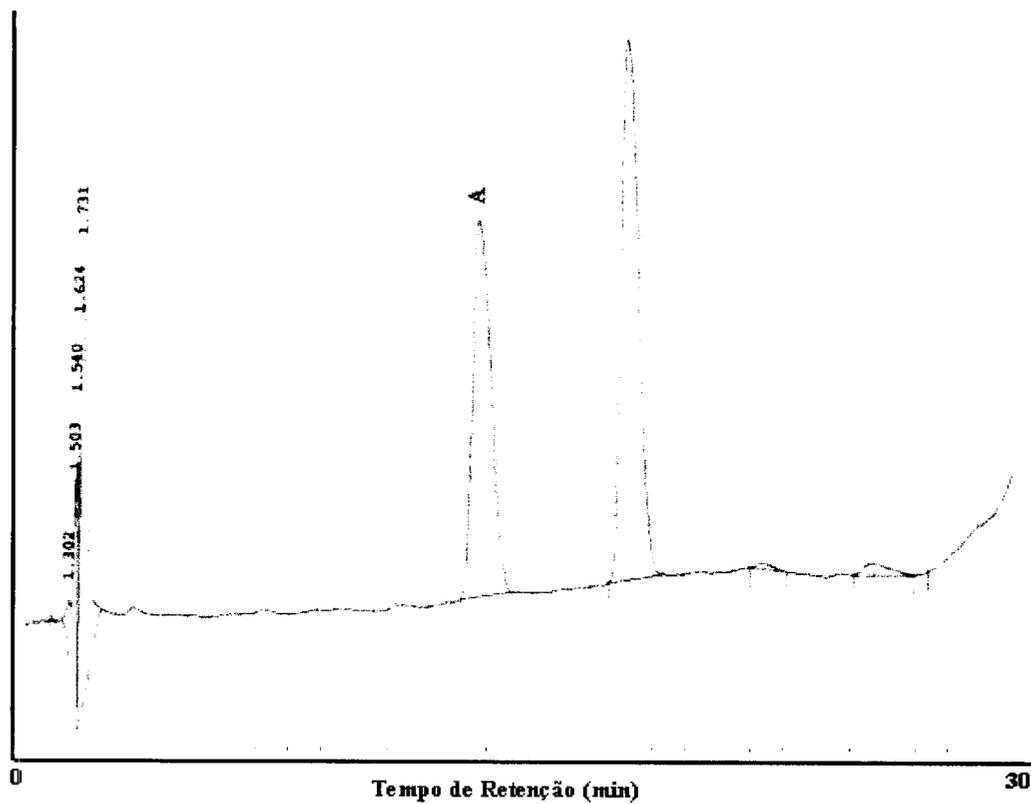


Figura 24: Cromatograma a 254 nm da separação de extracto de plasma de congro após separação pelo método I de HPLC e TLC.

### 3. Níveis de vitelogenina plasmática

A proteína vitelogénica foi doseada indirectamente pela determinação do Pi presente no plasma. O congro 1, que foi apenas injectado uma vez, não apresentou qualquer variação relativamente à quantidade de VTG em circulação, com valores entre 7,58  $\mu\text{Pi/ml}$ , antes do tratamento, e de 7,65  $\mu\text{Pi/ml}$ , após o tratamento. Relativamente ao congro 2, ao qual foram administradas seis injeções, os níveis de VTG estão apresentados na tabela 5.

**Tabela 5:** Níveis de VTG no plasma do congro 2 injectado com LHRHa, PIM e 17P. Aos 75 dias foi substituída a 17P por E2.

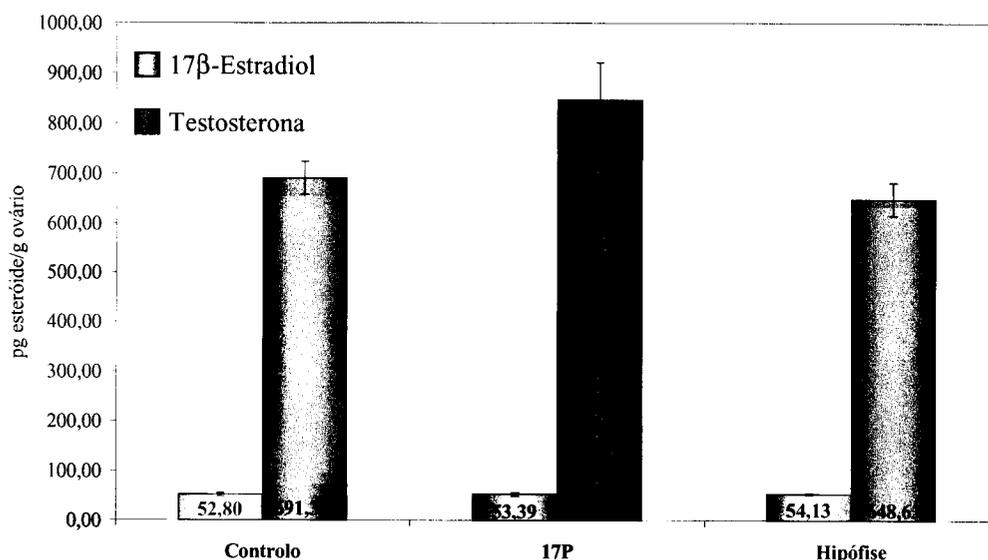
Tempo (dias)	VTG $\mu\text{gPi/ml}$ plasma
0	7.69
15	9.79
30	6.73
45	7.59
60	7.52
75 (*)	6.58
90	32.85

(\*) – Administração de E2 como esteróide

Os níveis de VTG mantiveram-se na mesma ordem de valores até aos 75 dias, verificando-se uma aumento significativo (80,0 %) aos 90 dias, após administração de E2, em vez de 17P.

#### 4. Esteroidogénese *in vitro*

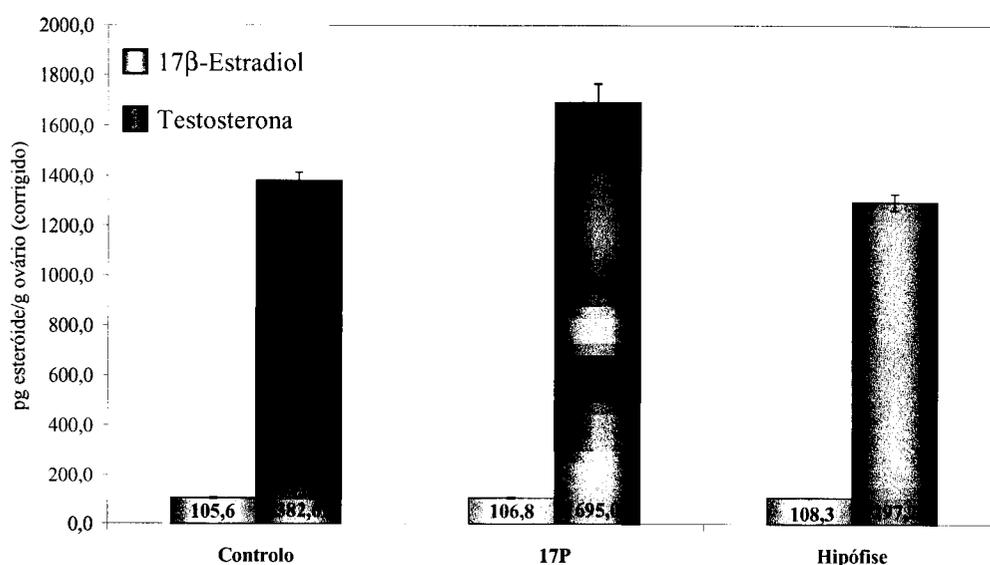
O ovário do congro 1 foi incubado seguindo o procedimento descrito para os animais selvagens e, tal como se tinha verificado, a gónada deste animal também sintetiza T e E2 *in vitro* (fig. 25).



**Figura 25:** Níveis de T e de E2 sintetizados pelo ovário do congro 1.

Verificou-se um aumento de 18,4 % na síntese de T na presença de 17P, em relação à situação controlo, enquanto que para os animais selvagens o aumento foi de 28,3 %. A quantidade de T sintetizada pelo ovário do congro, tratado com LHRHa associada ao PIM, foi superior à dos animais selvagens nas três situações em que foi incubado. O ovário do congro 1 produziu 691,3 pg T/g ovário, enquanto que nos animais selvagens a quantidade de T na situação controlo foi de 153,4 pg/g de ovário. Na incubação com 17P os níveis de T produzidos foram de 847,4 pg/g ovário, e nos animais selvagens foi de 213,9 pg T/g ovário. Mais uma vez, o ovário deste animal não respondeu à presença de extracto de hipófise de truta no meio de incubação, sendo os níveis de T semelhantes aos da situação controlo.

No caso do E2 sintetizado pelo ovário do congro tratado não se observou qualquer resposta à presença do precursor, nem do precursor e extracto de hipófise, sendo os níveis de E2 semelhantes aos encontrados nas incubações com ovário de espécimes selvagens.



**Figura 26:** Níveis de T e de E2 sintetizados pelo ovário, sem os lípidos totais, do congro 1.

A percentagem de lípidos presente no ovário do congro 1 era de 50 %. Na figura 26 estão representados os níveis de T e de E2 sintetizados pelo ovário deste animal subtraindo os lípidos totais e referindo a produção destes esteróides por peso de ovário, o que, tal como aconteceu nas incubações de ovário de congros selvagens, apenas aumenta a quantidade de esteróide sintetizado pelo ovário, sem alterar a relação que existe entre as três situações de incubação.

Os esteróides sintetizados pelos oócitos desta fêmea foram doseados por HPLC, tendo-se detectado apenas a presença de A (níveis superiores a 1 ng/g ovário), em todas as situações em que o tecido foi incubado. O esteróide maturativo, 17,20βP, não foi encontrado em nenhum dos métodos de HPLC utilizados.

## Discussão

Como não tivemos acesso a congros em estado maturativo, o objectivo deste ensaio foi o de induzir a maturação pela administração da hormona libertadora da hormona luteinizante [D-ALA<sup>6</sup>]-LHRHa, associada ao agente antidopaminérgico, pimozide (PIM).

Ao congro 1 foi administrada apenas uma dose de hormona, e após 15 dias a histologia do ovário revelou uma fêmea com morfologia semelhante à das fêmeas selvagens com IGS>1%. O ovário apresentava uma matriz de células adiposas com oócitos vitelogénicos dispostos na periferia do ovário. Os oócitos tinham um diâmetro médio superior (230 µm) ao dos animais selvagens o que pode ser, ou não, consequência do tratamento hormonal, visto não existir termo de comparação antes da administração da hormona. Com apenas uma injeção de hormona não foi possível atingir o estado de migração do núcleo, que ocorre em oócitos maduros, tal como foi conseguido com *Anguilla diffenbachii* (Lokman e Young, 1998), com hipófise de salmão, porque este animal estaria numa fase menos avançada do seu desenvolvimento.

Neste congro verificou-se um aumento dos níveis plasmáticos de A, T e E2 15 dias após a administração de LHRHa, associada ao PIM. O esteróide presente em maior quantidade foi a A, esteróide sintetizado via liase a partir da 17P, aumentando para níveis superiores a 1ng/ml de plasma após a administração de hormona. Os níveis de T (10,94 ng/ml plasma) antes do tratamento eram superiores aos níveis detectados em animais selvagens, onde o máximo detectado foi de 4,0 ng/ml de plasma. A quantidade de E2 detectada (282,9 pg/ml plasma) é semelhante aos valores de E2 encontrados nos outros congros. O aumento destes esteróides após a administração da hormona sugere que ocorreu uma activação do eixo hipotálamo-hipófise-gónada, tal como aconteceu com enguia japonesa tratada com LHRHa (Lin, *et al.*, 1990). O facto de se atingirem níveis mais elevados de A e de T do que de E2, sugere uma actividade reduzida da aromatase, quando comparada com a liase e HSD, enzimas responsáveis pela conversão de 17P em A, e A em T. Neste animal não foi detectada a presença de 17,20βP no sangue.

A quantidade de proteína vitelogénica no sangue deste animal manteve-se constante, mesmo após o tratamento, e em níveis semelhantes ao dos animais selvagens, na ordem dos 8 µg Pi/ml de plasma o que, mais uma vez, demonstra que a quantidade circulante de E2 não é suficiente para estimular a síntese de VTG pelo fígado.

Tal como nos animais selvagens, avaliou-se a capacidade dos folículos de congro sintetizarem esteróides *in vitro*. Por RIA foram doseados T e E2, e por HPLC doseou-se A e 17,20 $\beta$ P, verificando-se que, neste caso, os oócitos também têm a capacidade de sintetizar esteróides. No entanto, produziram níveis mais elevados de T em qualquer um dos tratamentos, do que nos congros não tratados, enquanto que para o E2 a quantidade é da mesma ordem de grandeza. Estes resultados são semelhantes aos apresentados por Ijiri *et al.*, (1995), onde se demonstra que a produção de T não é um passo limitante na produção de E2, mas sim a actividade da aromatase, tal como aconteceu nos animais selvagens estudados. Como o precursor utilizado nas incubações foi a 17P, e por HPLC se detectaram níveis elevados de A, e por RIA de T, podemos concluir que nestes animais a fraca actividade da aromatase foi, mais uma vez, o factor limitante da síntese de E2.

Tal como tinha acontecido anteriormente, não houve qualquer resposta à presença de extracto de hipófise de truta. Os valores de T e E2 são semelhantes aos observados apenas na presença do precursor. Com este resultado podemos igualmente afirmar que os receptores não reconhecem a GTH de truta, visto que no plasma se verifica um aumento de T e de E2 após o tratamento com LHRHa, o que indica que ocorre activação do eixo hipotálamo-hipófise-gónada.

Nas incubações *in vitro* também não se detectou qualquer produção de 17,20 $\beta$ P, tal como no plasma. O que nos leva a concluir que, ou ainda não ocorre síntese do esteróide maturativo, se este for o desta espécie, ou existe outro esteróide maturativo, apesar de o 17,20 $\beta$ P ser ter sido considerado em várias espécies como o esteróide maturativo, por exemplo em solha (*Pleuronectes platessa*), (Scott *et al.*, 1998), mas principalmente em salmonídeos (Yoshikuni and Nagahama, 1991). Noutras espécies, como no robalo, *Dicentrarchus labrax*, foi encontrado um outro esteróide como indutor da maturação, o 17,20 $\beta$ ,21-trihidroxí-4-pregnen-3-ona (17,20 $\beta$ ,21P), enquanto que o 17,20 $\beta$ P foi detectado em níveis muito baixos, no entanto conjugados (sulfatos) deste esteróide aumentam meses antes da ovulação, sendo eliminados rapidamente após a ovulação (Rocha e Reis-Henriques, 1999). Na enguia japonesa a ovulação pode ser induzida com injeções de 17,20 $\beta$ P, mas apenas quando os oócitos atingem um certo diâmetro, pelo que antes desse tamanho não respondem à presença do esteróide (Ohta *et al.*, 1997).

Ao congro 2 foram administradas seis doses de LHRHa, associada ao PIM. Deste animal não foi recolhido ovário, assumindo-se como fêmea pelo seu tamanho, que tal

como foi descrito por Bauchot e Saldanha (1986), são de maiores dimensões que os machos. Para *C. oceanicus* Hood, *et al.* (1988) demonstraram que os machos não ultrapassam os 50 cm. Outro facto que nos levou a assumir que este animal era uma fêmea foram os níveis de T e de E2, que são da mesma ordem dos apresentados por todas as outras fêmeas.

A quantidade circulante de A, de T e de E2 neste animal, também aumentou em resposta à presença de LHRHa, PIM e 17P. Mais uma vez, o esteróide presente em níveis mais elevados foi a A. O aumento mais significativo de T (14,63 ng/ml plasma) e de E2 (385,9 pg/ml plasma) foi observado aos 60 dias, ocorrendo uma diminuição aos 75 dias (10,7 ng T/ml plasma e 318,5 pg E2/ml plasma), onde o níveis de E2 não ultrapassaram valores detectados em congros selvagens. Esta diminuição de T e de E2 pode dever-se a uma diminuição da actividade da HSD e da aromatase. Enquanto que no congro 1 não foi detectado o 17,20 $\beta$ P, neste animal por HPLC foi possível detectar o 17,20 $\beta$ P a partir do sistema de eluição com acetonitrilo:água. Após TLC e pelo método II de HPLC não foi detectado, o que pode indicar que a concentração no sangue é baixa (<1ng/ml plasma).

Os níveis de VTG no sangue deste animal foram sempre semelhantes aos dos congros selvagens, entre 7  $\mu$ g Pi/ml plasma e 10  $\mu$ g Pi/ml plasma. Durante os 75 dias em que decorreu o tratamento os níveis de E2 nunca ultrapassaram os valores dos animais selvagens que, como já foi referido, não era suficiente para estimular a síntese de VTG pelo fígado. Aos 75 dias efectuou-se a administração de LHRHa e PIM, não com 17P mas com E2. O aumento de E2 no sangue reflectiu-se num aumento de 80,0 % nos níveis de VTG, tal como acontece em outras espécies, por exemplo truta arco-íris (Reis-Henriques, 1997), onde a presença de quantidades elevadas de E2 no plasma estimula a síntese da proteína vitelogénica no fígado.

Neste trabalho a maturação por tratamento hormonal não foi conseguida. De facto, apesar de se ter provado que ocorreu activação do eixo hipotálamo-hipófise-gónada, outros factores faltaram para que a maturação fosse atingida. O desenvolvimento sexual dos animais era muito precoce, com baixos níveis de E2 e VTG. O facto de o animal se encontrar em cativeiro, por si só, já constitui uma alteração às condições normais de desenvolvimento, supondo-se que para atingir o estado final da maturação necessite de permanecer a maior profundidade, sendo também o factor temperatura uma condicionante a considerar.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pela análise de todos os dados recolhidos neste trabalho, relacionado com a reprodução em fêmeas da espécie *Conger conger*, vamos elaborar as considerações finais, visto ser apenas um trabalho preliminar no que se refere a este tema.

- Nesta espécie, e a partir da morfologia da gónada, foram encontradas fêmeas apresentando ovário com oócitos primários e em vitelogénese.
- Os esteróides T e E2, revelaram uma relação com o desenvolvimento da gónada, sendo detectados em quantidades mais elevadas no plasma de animais com ovário mais desenvolvido.
- Não foi detectada a presença no plasma do esteróide maturativo 17,20 $\beta$ P porque não se encontravam num estado de desenvolvimento próximo da maturação.
- Os níveis de VTG foram sempre baixos e sem qualquer relação com o desenvolvimento sexual dos animais.
- Pelo tratamento prévio de fragmentos de ovário com colagenase, específica para adipócitos, obteve-se uma fracção mais rica em oócitos, o que permitiu um melhor rendimento na produção de esteróides.
- Fragmentos de ovário tratados com colagenase, e incubados na presença de 17P como precursor, quando comparados com o controlo, sintetizam níveis mais elevados de T e de E2, embora este último numa percentagem menor o que indicou uma actividade mais reduzida da aromatase.
- Verificou-se que as fêmeas com IGS superior a 1 % apresentavam no ovário uma grande quantidade de células adiposas, com lípidos ricos em ácidos gordos de cadeia longa.
- O EPA e o DHA, ácidos gordos importantes para qualidade dos ovos e, conseqüentemente, na sobrevivência das larvas, foram detectados nos lípidos presentes no ovário desta espécie.
- Nos animais tratados com LHRHa e PIM e o esteróide precursor 17P os níveis no plasma de A, T e E2 aumentaram, indicando activação do eixo hipotálamo-hipófise-gónada.

- O esteróide 17,20 $\beta$ P foi detectado em baixa quantidade no plasma por HPLC, com o primeiro sistema de eluição.
- No animal em que se administrou uma injeção de E2 os níveis de VTG aumentaram significativamente.
- A incubação *in vitro* de oócitos do animal tratado mostrou igualmente um aumento da concentração, no meio de incubação, de A, T e E2.

Este estudo permitiu-nos contribuir para o conhecimento do comportamento reprodutivo desta espécie. Os esteróides encontrados e a sua função são idênticos aos demonstrados para outras espécies, embora fique ainda a dúvida do esteróide que actuará na maturação.

Um ponto de salientar é a riqueza em células adiposas que podemos pensar serem a reserva de nutrientes para a migração do animal até ao local de postura, assim como, a presença de ácidos gordos de cadeia longa, importantes para a qualidade dos ovos e consequentemente para a sobrevivência das larvas.

---

**BIBLIOGRAFIA**

- Ackman, R.G. (1994). Composition and nutritive value of fish and shellfish lipids. *In: Fish and fisheries products.* (eds.) Ruyter, A.
- Ackman, R.G., MacPherson, E.J. and O'Dor, R.K. (1991). Fatty acids of depot fats from the blue-banded sea snake (*Laticuda colubrine*) and its principal food the conger eel (*Conger cinerus*). *Comp. Physiol. Biochem* **98B**: 423-425.
- Almansa, E., Perez, M.J., Cejas, J.R., Badia, P., Villamandos, J.E., Lorenzo, A. (1999) Influence of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurat* L.) dietary fatty acids on egg quality and egg fatty acids composition throughout the spawning season. *Aquaculture* **170**: 323-336.
- Arts, M.T., Ackman, R. and Holub, B. (2001). "Essential fatty acids" in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **58**: 122-137.
- Bang, H. O. and Dyerberg, J. (1985). Fish consumption and mortality from coronary heart disease. *New Engl. J. Med.* **313**: 822-823.
- Bauchot, M.L. e Saldanha, L. (1986) Congridae. *In Fishes of the Northern-Eastern Atlantic and in the Mediterranean.* Whitehead, J.P., Bauchot, M.L., Hureau, J.C., Nielsen, J., Tortonese, E. (eds.), UNESCO, Paris, Vol. II, 567-574.
- Boetius, I. and Boetius, J. (1980). Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* **1**: 1-28.
- Brooks, S., Tyler, C.R. and Sumpter, J.P. (1997). Egg quality in fish: what makes a good egg? *Rev. Fish Biol.Fish.* **7**: 387-416
- Burzawa-Gerard, E., and Dumas-Vidal, A. (1991). Effects of 17 $\beta$ -estradiol and carp gonadotropin on vitellogenesis in normal and hypophysectomized European silver female eel (*Anguilla anguilla* L.) employing a homologous radioimmunoassay for vitellogenin. *Gen. Comp. Endocrinol.* **84**: 264-276.
- Cau, A. and Manconi, P. (1983) Sex-ratio and spatial displacement in *Conger conger* (L.). *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*, **28** :93-96
-

- Cau, A. and Manconi, P. (1984) Relationship of feeding ecology, reproductive cycle and bathymetric distribution in *Conger conger*. *Mar. Biol.* **81**: 147-151
- Chang, J.P. e Peter, R.G. (1983). Effects of pimozide and des Gly<sup>10</sup>, (D-ALA<sup>6</sup>)-luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on serum gonadotropin concentrations, germinal vesical migration, and ovulation in female goldfish, *Carassius aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **52**: 30-37.
- Dave, G., Johansson, M.L., Larson, A., Lewander, K. and Lidman, U. (1974). Metabolic and haematological studies on the yellow and silver phase of the European eel, *Anguilla anguilla* L. II. Fatty acid composition. *Comp. Biochem. Physiol.* **47B**: 583-591.
- Dave, G., Johansson, M.L., Larsson, A., Lewander, K. and Lidman, U. (1976). Metabolic haematological effects of starvation in European eels, *Anguilla anguilla* L. III- Fatty acids composition. *Comp. Biochem. Physiol.* **53B**: 509-515.
- Deadman, N.M. (1989). Effects of change in fat, fish and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: Diet and Reinfarction Trial (DART). *Lancet* **II**: 757-760.
- Dye, H.M., Sumpter, J.P., Fagerlund, U.H.M. and Donaldson, E.M. (1986). Changes in reproductive parameters during spawning migration of pink salmon, *Oncorhynchus gorbusca* (Walbaum). *J. Fish Biol.* **29**: 167-176.
- Fannon, H., Fahy, E. and O'Reilly, R. (1990) Maturation in female conger eel, *Conger conger* (L.) *J. Fish Biol.* **36**: 275-276.
- Fishelson, L. (1994) Comparative internal morphology of deep-sea eels, with particular emphasis on gonads and gut structure. *J. Fish Biol.* **44**: 75-101.
- Fitzpatrick, M.S., Pereira, C.B. and Schreck, C.B. (1993). *In vitro* steroid secretion during early development of mono-sex rainbow trout: sex differentiation, onset of pituitary control, and effects of dietary steroids treatment. *Gen. Comp. Endocrinol.* **91**: 199-215.
- Fostier, A., Breton, B., Jalabert, B. et Marcuzzi, O. (1981). Evolution des niveaux plasmatiques de la gonadotropine glycoprotéique et de la 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogesterone au cours de la maturation et de l'ovulation chez la truite arc-en-ciel, *Salmo gairdneri*. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **293D**: 817-820.

- Holland, M.C., Hassin, S. and Zohar, Y. (2000). Gonadal development and plasma steroid levels during pubertal development in captive-reared striped bass, *Morone saxatilis*. *J. Exp. Zool.* **286**: 49-63.
- Hood, P.B., Able, K.W. and Grimes, C.B. (1988) Biology of the Conger eel *Conger oceanicus* in the Mid-Atlantic Bight. I. Distribution, age, growth and reproduction. *Marine Biol.* **98**: 287-596.
- Ijiri, S., Kazeto, Y. Takeda, N., Chiba, H., Adachi, S., and Yamauchi, K. (1995). Changes in serum steroid hormones and steroidogenic ability of ovarian follicles during artificial maturation of cultivated Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* **135**: 3-16.
- Izquierdo, M.S. (1996). Review article: Essential fatty acids requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture nutrition* **2**: 183-191.
- Kagawa, H., Tanaka, H., Ohta, H., Okuzawa, K. and Hirose, K. *In vitro* effects of  $17\alpha$ -hydroxiprogesterone and  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one on final maturation of oocytes at various development stages in artificially matured Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Sci.* **61(6)**: 1012-1015.
- Kime, D.E. (1987) The steroids. *In*: The fundamental of comparative vertebrate endocrinology. Chester-Jones, I., Ingleton, P.M. and Philips, J.G. (eds.), Plenum Press, New York, U.S.A., pp 3-56.
- Lancaster, P.M. and Tyler, C.R. (1994). Developmental expression and modulation of the vitellogenin receptor in ovarian follicles of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.* **269**: 458-466.
- Lin, H., Zhang, M., Zhang, S., Van Der Kraak, G. and Peter, R.E. (1990). Effects of sex steroids, (D-ALA<sup>6</sup>, PRO<sup>9</sup>-N-ETHYLAMIDE)-LHRH and domperidone (DOM) on gonadotropin secretion in female silver eel, *Anguilla japonica*. Hirano, R. and I.Hanyu, editors. The second Asian Fisheries Forum. 991P. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines
- Lokman, P.M. and Young, G. (1995). *In vitro* biosynthesis of oestradiol- $17\beta$  and  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxi-4-pregnen-3-one by vitellogenic ovarian follicles from migrating New Zeland longfinned eels (*Anguilla dieffenbachia*). *Aquaculture* **135**: 17-26.

- Lokman, P.M. and Young, G. (1998). An intersexual migratory (silver) long finned New Zealand eel and its gonadal response to treatment with salmon pituitary homogenate. *J. Fish Biol.* **52**: 547-555.
- McCleave, J. and Miller, M.J. (1994) Spawning of *Conger triporiceps* (Congridae) in the Sargasso Sea and subsequent distribution of leptocephali. *Envir. Biol. Fishes* 39:339-355.
- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M. and Tanaka M. (1995) Regulation of oocyte maturation in fish. In Sherwood, N.M. and Hew, C.L., eds. *Fish Physiology*, Vol. XIII. New York: Academic Press, pp. 339-439.
- Norma portuguesa-974 (1986). Gorduras e óleos comestíveis, Diário da República, Série III de 13.02.1986
- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Iinuma, N. and Hirose, K. (1997). Artificial induction of maturation and fertilization in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol. Biochem.* **17**: 163-169.
- Okamura, A., Utoh, T., Zhang, H., Yamada, Y., Horie, N., Mikawa, N., Motonobu, T. and Oka, H. (2000). Seasonal changes in maturity in the conger eel *Conger myriaster* at the Pacific Coast of Atsumi Peninsula, Central Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* **66(3)**: 412-416.
- Okuba, K., Suetake, H., Usami, T., and Aida, K. (2000) Molecular cloning and tissue-specific expression of a gonadotropin-releasing hormone receptor in the Japanese eel. *Gen. Comp. Endocrinol.* **119**: 181-192.
- Otwell, W.S. and Richards, W.L. (1981/2). Cultured and wild American eels, *Anguilla rostrata*: Fat content and fatty acids composition. *Aquaculture* **26**: 67-76.
- Peter, R.E. and Yu, K.L. (1997) Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Reviews Fish Biol. Fisheries* **7**: 173-197.
- Reis-Henriques, M.A. (1998) A reprodução nos peixes. In: Manual de Aquacultura. Edt. Reis-Henriques, M.A.
- Reis-Henriques, M.A., Cruz, M.M., and Perira, J.O. (1997) The modulating effect of vitellogenin on the synthesis of 17 $\beta$ -estradiol by rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) ovary. *Fish Physiol. Biochem.* **16**: 181-186.

- Reis-Henriques, M.A., Ferreira, M., Silva, L. and Dias, A. (2000). Evidence for an involvement of vitellogenin in the steroidogenic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenic oocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **117**: 260-267.
- Rocha, M.J. (1996) Estudo da endocrinologia da reprodução em peixes. Tese Doutorado. Universidade do Porto.
- Rocha, M.J. and Reis-Henriques, M.A. (1999). Plasma levels of C<sub>18</sub>-, C<sub>19</sub>- and C<sub>21</sub>-steroids in captive and feral female sea bass. *J. Fish Biol.* **55**: 26-34.
- Rodríguez, C., Cejas, J.R., Badía, V.M., Samper, P., Lorenzo, M. (1998) Influence of n-3 highly unsaturated fatty acids deficiency on the lipids composition of broodstock gilthead (*Sparus aurata* L.) and on egg quality. *Fish Physiol. Biochem* **18**: 177-187.
- Ruyter, B. and Thomassen, M.S. (1999). Metabolism of n-3 and n-6 fatty acids in Atlantic salmon liver: stimulation by essential fatty acids deficiency. *Lipids* **34**: 1167-1176.
- Ruyter, B., Køsjø, C., Måsøval, K., Einen, O. and Thomassen, M.S. (2000) Influence of dietary n-3 fatty acids on the denaturation and elongation of [1-14C] 18:2n-6 and [1-14C] 18:3 n-3 in Atlantic salmon hepatocytes. *Fish Physiol. Biochem.* **23**: 151-158.
- Schmidt, J. (1931) Eels and conger eels of the North Atlantic. *Nature*, London. **128**: 602-604.
- Scott, A. (1987) Reproductive endocrinology of fish. In: The fundamental of comparative vertebrate endocrinology. Chester-Jones, I., Ingleton, P.M. and Philips, J.G. (eds.), Plenum Press, New York, U.S.A., pp 223-255.
- Scott, A. P., Sheldrick, E. L. and Flint, A. P. F. (1982). Measurement of 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in plasma of trout (*Salmo gairdneri* Richardson): Seasonal changes and response to salmon pituitary extract. *Gen. Comp. Endocrinol.* **46**: 444-451.
- Scott, A. P., Sumpter, J.P. and Hardiman, P.A. (1983). Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Gen. Comp. Endocrinol.* **49**: 128-134.
- Scott, A.P., Witthames, P.R., Turner, R.J. and Canario, A.V.M. (1998). Plasma concentrations of ovarian steroids in relation to oocyte final maturation and ovulation in female plaice sampled at sea. *J. Fish Biol.* **52**: 128-145.
- Sherwood, N.M., Parker, D.B., McRory, J.E. and Lescheid, D.W. (1994). Molecular evolution of growth hormone-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone. In: Fish

- 
- Physiology, Vol XIII. (eds.) Sherwood, N.M. and Hew, C.L.. New York, Academic Press, pp 3-66.
- Shibata, N., Yoshikuni, M., and Nagahama, Y. (1993). Vitellogenin incorporation into oocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *in vitro*: effect of hormones on denuded oocytes. *Dev. Growth Differ.* **35**: 115-121.
- Specker, J.L. and Sullivan, C.V. (1994). Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. *Persp. Comp. Endocri.* pp 304-315
- Sugii, K., Watanabe, T. and Kinumaki (1988). Fatty nutrients of cultured eel. *Bull. Tokai reg. Lab.* **126**: 37-48.
- Susca, V., Corriero, A., Bridges, C.R. and De Metrio, G. (2000). Study of sexual maturity of female bluefin tuna: purification and partial characterization of vitellogenin and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Fish Biol.* **58**: 815-831.
- Suzuki, K., Kawauchi, H. e Nagahama, Y. (1988a) Isolation and characterization of subunits from two distinct salmon gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.* **71**: 302-306.
- Suzuki, K., Nagahama, Y. e Kawauchi, H. (1988b) Steroidogenic activities of two distinct salmon gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.* **71**: 452-458.
- Tung, P.S. and Fritz, I.B. (1998). Isolation of sertoli cells and their properties in culture. *Cell Biology: A laboratory book, Second Edition, Vol.1.* Academic Press.
- Tyler, C. R., Sumpter, J.P. and Bromage, N.R. (1988). In vivo ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout *Salmon gairdneri*. *J. Exp. Zool.* **246**: 171-179.
- Tyler, C.R. and Lancaster, P.M. (1993). Isolation and characterization of the receptor for vitellogenin from follicles of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Comp. Physiol.* **163**: 219-224.
- Tyler, C.R. and Sumpter, J.P. (1996) Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish Biol. Fisheries* **6**: 287-318.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P., Kawauchi, H. and Swanson, P. (1991) Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **84**: 291-299.
-

- Villalonga, M.S. (1999). Biologia, distribuição e abundância do safio (*Conger conger*) na costa portuguesa. Relatório de Estágio, Lisboa.
- Watanabe, T. (1992) Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **73B**: 3-15
- Wheeler, A. (1969) The Fishes of the British Isles and North-west Europe. East Lansing: Michigan State University Press.
- Yoshikuni, M. e Nagahama, Y. (1991) Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Bull.Inst. Zool., Academia Sinica, Monograph* **16**, 139-172.
- Yoshiura, Y. Suetake, H. And Aida, K. (1999). Duality of gonadotropin in a primitive teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **114**: 121-131.
- Young, G., Kagawa, and Nagahama, Y. (1983) evidence for a decrease in aromatase activity in the ovarian granulosa cells of amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, associated with final oocyte maturation. *Biol. Reprod.* **29**: 310-315.
- Zanuy, S. e Carrilho, M. (1987). La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura. *In: Reproducción en acuicultura*. Eds.: Monteros J.E. e Labarta, U. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, Madrid, pp:1-102.