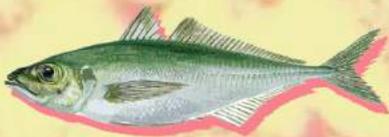
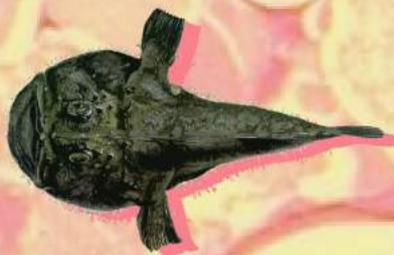


# WORKSHOP DE HISTOLOGIA



CARAPAU



TAMBORIL



FANEÇA



SARDINHA



ANCHOVA



SARDA



LULA



RAIA



CAVALA



TUBARÃO CAROCHO



PESCADA



COMISSÃO EUROPEIA

Fundos Estruturais



# Workshop de Histologia



COMISSÃO EUROPEIA

Fundos estruturais



Título: Workshop de histologia

Autor: NeoMAv

Editor: Ana Maria Costa

ISBN: 978-972-9372-32-2

**Referência Bibliográfica:NeoMAv, 2008. Workshop de Histologia. IPIMAR, Lisboa, 22-23 de Novembro de 2006 e 18-22 de Junho de 2007, 29 pág. + XXIII Apresentações (ed. Costa, A. M.).**

*Projecto NeoMav”Novas Metodologias de Avaliação”*

*Coordenação de Ana Maria Costa (Fase I)*

*e Beverly Macewicz (Fase II)*

## ÍNDICE

	Pág.
<b>Resumo / Abstract</b> .....	1
<b>Introdução</b> .....	2
<b>Participantes</b> .....	2
<b>Termos de referência</b> .....	3
<b>Discussão dos temas abordados</b>	
<b>Importância da histologia em estudos de reprodução</b> .....	4
<b>Amostragem</b> .....	4
<b>Tempo que medeia entre a recolha e a fixação das amostras</b> .....	4
<b>Preservação, conservação das amostras e processamento</b>	
<b>das amostras</b> .....	5
<b>Técnicas de histologia</b> .....	5
<b>Características histológicas das fêmeas maduras</b> .....	6
<b>Identificação histológica do desenvolvimento dos oócitos e dos</b>	
<b>estados de atresia</b> .....	7
<b>Identificação e datação dos FPOs</b> .....	7
<b>Estimação da fecundidade</b> .....	8
<b>Fracção de desova e MPDO</b> .....	8
<b>Ogivas de maturação</b> .....	8
<b>Apresentações e documentos de trabalho</b> .....	9
<b>Adenda ao programa do workshop</b> .....	17
<b>Recomendações</b> .....	18
<b>Questões a abordar futuramente</b> .....	20
<b>Referências bibliográficas</b> .....	22
<b>ANEXO 1</b> .....	24
<b>ANEXO 2</b> .....	28

## ► **Resumo**

No seguimento dos objectivos e plano de actividades do projecto NeoMAv realizou-se no IPIMAR um workshop de histologia, que decorreu em duas fases, de 22 a 23 de Novembro de 2006, com a coordenação de Ana Maria Costa, e de 18 a 22 de Junho de 2007, com a coordenação de Beverly Macewicz. Este workshop teve por objectivo analisar e discutir aspectos sobre técnicas histológicas, importância da conservação do material, identificação dos diferentes estados de maturação das gónadas, desenvolvimento oocitário e determinação da fecundidade. Estas questões-chave foram discutidas com pormenor usando como casos-estudo as espécies alvo do projecto – carapau, pescada e tamboril – e aplicadas às outras espécies de peixes – sardinha, sarda, cavala, faneca e anchova – elasmobrânquios – raias e tubarões – e cefalópodes – lula, incluídas nos trabalhos. A reunião teve 23 participantes, de Portugal, Espanha, Brasil e EUA.

Este relatório fornece informação sobre os diversos temas abordados: amostragem (como e quando fazer uma boa amostragem); fixação/conservação (qual a forma correcta de fixar e conservar as amostras); técnicas de histologia (qual o meio de inclusão a utilizar; como fazer bons cortes); cuidados na observação dos cortes (objectivo do estudo); métodos de produção de ovos (MPDO e MPAO).

As principais recomendações deste workshop são: (a) as gónadas utilizadas para histologia nunca podem ser congeladas; (b) o fixador deve ser o adequado à espécie em estudo e colocado no frasco num volume igual a 5 ou 6 vezes o volume da gónada; (c) quando se pretendem datar os FPOs devem colocar-se na mesma lâmina cortes sequenciais; (d) na aplicação do MPDO a presença de FPOs velhos não exclui esse indivíduo da determinação da fecundidade parcial; (e) na aplicação do MPAO apenas os estados de  $\alpha$  atresia devem ser contabilizados; (f) em espécies com dimorfismo sexual (caso da pescada) as ogivas de maturação devem ser feitas com os dois sexos combinados.

Como resultado final deste workshop será elaborado um Manual para o Processamento de Amostras de Gónadas para Histologia.

## ► **Abstract**

Accordingly with the objectives of NeoMAv project an histology workshop was carried out at IPIMAR, from 22 to 23 of November 2006, with the coordination of Ana Maria Costa, and from 18 to 22 of June 2007, coordinated by Beverly Macewicz. The main objectives of this workshop were to analyse and discuss several aspects of histological procedures, preservation of the gonads, identification of maturity stages, oocyte development and determination of fecundity. These questions were particularly discussed using as study-cases the project target species – horse mackerel, hake and monkfish – and then applied to other fish species – sardine, mackerel, pouting and anchovy – elasmobranchs – rays and sharks – and cephalopods – squids, which were included in the workshop. Twenty three participants were present, from Portugal, Spain, Brasil and USA.

This report gives some information on the discussed themes, such as: sampling procedures (how to make a good sampling); fixation and conservation of the material (information about the correct way to preserve the gonads); histology procedures (which is the correct embedding medium; how to get good slides); egg production methods (DEPM and AEPM).

The main recommendations from this workshop are: (a) the gonads used for histology must never be frozen; (b) the fixative must be adequated to the species and the volume in the bottle must be 5 to 6 times the volume of the gonad; (c) the slides must be sequential in order to age the POFs; (d) for the DEPM the presence of old POFs does not exclude that female for the determination of batch fecundity; (e) for the AEPM only the stages of  $\alpha$  atresia must be counted; (f) maturity ogives of species with sexual dimorphism (such as hake) must includ both sexes combined.

A Manual for the Processing of Gonads for Histology will be produced as a final result of this workshop.

## ► **Introdução**

A análise de cortes histológicos de gónadas de peixes desenvolve-se no IPIMAR desde o início dos anos 90, primeiro com a sardinha e posteriormente com o carapau, mas apenas em 2002, com a instalação do Laboratório de Fecundidade (DRM) se iniciou o processamento das gónadas. Assim, e com o objectivo de melhorar as técnicas utilizadas na preparação das amostras, bem como esclarecer certas dúvidas e uniformizar os critérios de leitura das lâminas, realizou-se este workshop de histologia, no âmbito do projecto Novas Metodologias na Avaliação – NeoMav (QCA-3/MARE-FEDER) com a presença de técnicos e investigadores não só do IPIMAR mas também de outros países. Em particular a presença de Beverly Macewicz, que com a sua experiência forneceu valiosas indicações tanto sobre a aplicação das técnicas histológicas como na aplicação dos resultados a estudos de fecundidade.

## ► **Participantes**

O Workshop teve os seguintes participantes:

- Ana Maria Costa – IPIMAR (Portugal) – Coordenadora da Fase I e responsável pela organização da Fase II
- Alberto Murta – IPIMAR (Portugal) – DRM (Fase II)
- Antonio Solla – IEO (Espanha) (Fase II)
- Augusta Moledo – IPIMAR (Portugal) – DAQ (Fase I)
- Bárbara Pereira – IPIMAR (Portugal) – Bolseira de doutoramento da FCT (Fases I e II)
- Beverly Macewicz – NOAA (EUA) – Coordenadora da Fase II
- Carlota Pérez – AZTI (Espanha) (Fase II)
- Carmo Silva – IPIMAR (Portugal) – Bolseira do DRM (Fases I e II)
- Cristina Morgado – IPIMAR (Portugal) – Bolseira do DRM (Fases I e II)
- Cristina Nunes – IPIMAR (Portugal) – Bolseira do DRM (Fases I e II)
- Domingas Cardoso – IPIMAR (Portugal) – Doutoranda do DRM (Fases I e II)
- Eduardo Soares – IPIMAR (Portugal) – DRM (Fases I e II)
- Elisabette Bilbao – AZTI (Espanha) (Fase II)
- Fátima Valentim –IBUFRJ (Brasil) – Doutoranda do DRM (Fase II)

- Inmaculada Martin – AZTI (Espanha) (Fase II)
- Joana Portugal – IPIMAR (Portugal) – Estagiária do DRM (Fase I)
- João Oliveira – IPIMAR (Portugal) – DRM (Fase I)
- João Pereira – IPIMAR (Portugal) – DRM (Fases I e II)
- Maria Korta – AZTI (Espanha) (Fase II)
- Maria Manuel Martins – IPIMAR (Portugal) – DRM (Fases I e II)
- Patrícia Gonçalves – IPIMAR (Portugal) – Bolseira do DRM (Fases I e II)
- Rafael Duarte – IPIMAR (Portugal) – Bolseiro do DRM (Fase II)
- Teresa Moura – IPIMAR (Portugal) – Bolseira de doutoramento da FCT (Fases I e II)

► **Termos de referência**

Além das já referidas espécies alvo – carapau, pescada e tamboril – foram várias as espécies referidas neste workshop: sardinha, sarda, cavala, anchova, faneca, bacalhau, lula e elasmobrânquios. As questões e problemas abordados incluíram-se nos seguintes pontos:

- Importância da histologia em estudos de reprodução
- Problemas relacionados com a conservação das amostras
- Tempo que medeia entre a recolha e a fixação das amostras
- Técnicas de histologia
- Amostragem
- Preservação, conservação e processamento das amostras
- Identificação histológica do desenvolvimento dos oócitos e dos estados de atresia
- Características histológicas das fêmeas maduras
- Identificação e datação dos folículos pós-ovulatórios
- Estimação da fecundidade
- Fracção de desova e MPDO
- Oogivas de maturação

► **Discussão dos temas abordados**

• **Importância da histologia em estudos de reprodução**

Os três Institutos representados no workshop – IPIMAR, IEO e AZTI – utilizam, em diversas espécies – carapau, pescada, sardinha, elasmobrânquios, lulas, tamboril, linguados e faneca – técnicas histológicas com o mesmo objectivo: obter escalas de maturação microscópicas para validação das escalas macroscópicas, corrigir as ogivas de maturação e fornecer informação sobre hora de postura, fracção de desova e fecundidade.

• **Amostragem**

Foi referido pelos responsáveis de cada espécie qual o tipo de amostragem realizada (campanhas de investigação ou comerciais, hora do dia, arte de pesca utilizada, informação recolhida de cada exemplar, etc.). No que se refere ao IPIMAR, as amostras analisadas têm diversas origens: determinadas espécies, como o carapau, a pescada e a sardinha, têm cruzeiros específicos, onde são realizados arrastos do nascer ao pôr do sol, preferencialmente durante a época de desova, sendo também obtidas amostras periódicas provenientes da pesca comercial. Outras espécies, como a sarda, a cavala, o tamboril, a faneca, a lula e as raias, são consideradas espécies acessórias e são obtidas nos cruzeiros realizados para as espécies alvo. Finalmente, os tubarões são amostrados nas lotas. As amostras de sarda analisadas no IEO são obtidas em cruzeiros trienais realizados, tal como no IPIMAR, durante as horas de dia, enquanto que a amostragem da anchova realizada pelo AZTI é obtida em navios comerciais que efectuem pesca durante 24 horas.

• **Tempo que medeia entre a recolha e a fixação das amostras**

O tempo que decorre entre a recolha das amostras e a sua fixação é de grande importância, em particular no que respeita aos folículos pós-ovulatórios (FPOs), visto que estas estruturas continuam a sua degeneração mesmo depois da morte do peixe. Este processo vai influenciar directamente a determinação de dois parâmetros importantes dos adultos: a fracção de desova (percentagem de fêmeas que estão a desovar por dia) e a hora de postura (hora do dia preferencial para a desova de uma espécie). Este problema suscita outra questão, que é a dificuldade de obter exemplares frescos de determinadas espécies, tais como tamboril, lulas, raias e tubarões, cujas descargas em lota são reduzidas e que são também pouco abundantes nos arrastos efectuados nos cruzeiros de investigação.

- **Preservação, conservação e processamento das amostras**

Foi discutida a importância de ter material fresco ou no mínimo refrigerado para que o processamento das amostras seja feito em boas condições. As amostras congeladas não podem ser objecto de histologia, devido ao facto de os cristais de gelo que se formam durante o processo de congelação rebentarem as estruturas internas dos oócitos, o que torna a sua observação impossível. Foram mostradas por Patrícia Gonçalves imagens de cortes de pescada de amostras frescas, refrigeradas e congeladas onde se verificam bem as diferenças inerentes aos diferentes tipos de conservação no que respeita ao aspecto das gónadas (Anexo 1 – I). As espécies carapau, pescada, sardinha, raias e linguados tiveram já os mesmos problemas com a congelação das amostras, facto que foi também mostrado por Bárbara Pereira em cortes de raias (Anexo 1 – II).

Foi indicado qual o fixador utilizado para cada espécie, sendo o formol comum a praticamente todas as espécies, diferindo apenas em certos casos a concentração (4 % ou 10 %), o neutralizador (borax ou carbonato de cálcio) e o facto de ser feito com água salgada, destilada ou da torneira. Estas diferenças parecem ter forte influência na qualidade dos cortes histológicos.

Para certas espécies, nomeadamente o carapau e a sardinha, o formol salino danifica os tecidos, sendo utilizada a água da torneira. Cristina Nunes mostrou imagens de cortes em que os oócitos apresentam uma zona central aparentemente vazia e onde se deveria identificar o núcleo. Foi levantada a hipótese de isto ser devido à acção que o formol salino poderá eventualmente ter sobre a cromatina do núcleo, fazendo com que depois do corte corado a sua presença não seja detectada. No caso da pescada as gónadas têm sido fixadas quer com formol salino a 10%, quer com formol tamponado a 4% e com qualquer um destes a qualidade dos cortes mantém-se.

Outra questão que foi abordada foi a passagem das gónadas para álcool. É metodologia corrente no IPIMAR que as gónadas recolhidas para histologia, independentemente da espécie, depois de fixadas em formol sejam mudadas para álcool a 70% passados 2-3 dias. Esta metodologia é baseada em referências de outros autores, nomeadamente Greer Walker *et al.* (1994) e Pires (1996), que indicam também o formol como fixador das gónadas e o álcool a 70% como conservante.

- **Técnicas de histologia**

O procedimento adoptado por rotina no laboratório de fecundidade consiste na inclusão das amostras em parafina. No entanto, determinadas espécies, como os

cefalópodes, cujos oócitos oferecem uma maior resistência ao corte, necessitam de ser incluídas em resina, estando, tanto o laboratório como os técnicos que lá trabalham, aptos a aplicar esta técnica alternativa. Foi discutida a aplicação das duas técnicas, com as vantagens e desvantagens de cada uma. A aplicação de parafina tem a vantagem de ser mais expedita, mais barata e mais fácil de operar com o micrótomo rotativo; como desvantagens deve referir-se que, sendo uma técnica que se desenvolve a quente, pode danificar alguns tecidos e o processo de coloração é mais demorado. A inclusão em resina tem a vantagem de ser desenvolvida a frio, o que permite manter a boa qualidade dos tecidos, e ter um método de coloração muito mais simples. No entanto, é um procedimento mais demorado e mais dispendioso e a operacionalidade do micrótomo de correção é mais problemática. Os cortes em resina apresentam uma maior nitidez e transparência, sendo aconselhável a sua execução quando se pretendem identificar determinadas estruturas ou iniciar o estudo microscópico de novas espécies. A qualidade dos cortes feitos em gónadas de raias com as duas técnicas foi comparada em imagens apresentadas por Bárbara Pereira, reconhecendo-se a melhor qualidade da resina (Anexo 1 – III).

Foi feita por Ana Costa a apresentação teórica das técnicas utilizadas para a inclusão de amostras em parafina, com base em fotografias tiradas no laboratório durante as várias fases do processo (Anexo 1 – IV).

Finalmente, foi também abordada a qualidade dos cortes, que quando em mau estado podem apresentar diversas falhas: rasgões, pregas, oócitos que saltaram e deixaram as membranas vazias, grânulos de vitelo espalhados pelo corte, má coloração, como foi exemplificado por imagens de maus cortes de sardinha mostradas por Cristina Nunes (Anexo 1 – V e VI) e de raias, apresentados por Bárbara Pereira (Anexo 1 – VII). Estes defeitos podem ter diversas origens, tais como, serem amostras congeladas, facas com bocas, temperatura da parafina demasiado elevada, temperatura ambiente (pode tornar os blocos de parafina demasiado moles ou demasiado rijos), tempo de permanência no banho antes de serem retirados para a lâmina e/ou excesso ou defeito de algum dos corantes. Foi no entanto referido que antes de entregar o trabalho ao responsável que o pediu os cortes são sempre triados preliminarmente pela técnica do laboratório de histologia, Carmo Silva, que elimina os que estiverem em más condições.

- **Características histológicas das fêmeas maduras**

Foram apontadas e descritas as características que identificam as fêmeas maduras, desde o início da vitelogénese, em que os alvéolos corticais se encontram junto à

membrana e se observam gotas de óleo dispersas no citoplasma, passando pela fase de aglutinação das gotas lipídicas, formando placas de vitelo situadas apenas de um dos lados do núcleo, até à migração do núcleo para o polo animal – fase designada por núcleo migrado. Neste ponto inicia-se a hidratação do oócito, que pouco depois será libertado. Todas estas fases têm duração variável nas várias espécies, estando fortemente dependentes da temperatura.

- **Identificação histológica do desenvolvimento dos oócitos e dos estados de atresia**

Foram mostradas pelos participantes imagens e lâminas com cortes histológicos com o objectivo de confirmar e/ou corrigir a identificação dos estados de desenvolvimento dos oócitos. Foi também discutida a identificação dos estados de atresia, com base na aparência da zona radiata dos oócitos e no grau de degradação do vitelo e qual a sua importância na determinação da fecundidade de uma dada espécie.

Comentário:

O WGMEGS recolhe amostras de cavala semanalmente, desde Fevereiro até ao início de Maio (até finais de Julho na parte norte do stock sul). O cálculo da atresia faz-se com os indivíduos que apresentam sinais de postura. Portanto, na realidade o stock sul é amostrado para atresia praticamente durante todo o período no que respeita ao golfo da Biscaia, estendendo-se por um período de vários meses que não só inclui o início como também toda uma parte importante da época de desova, tendo em conta que em Março ainda se encontram indivíduos em postura.

- **Identificação e datação dos folículos pós-ovulatórios**

Neste ponto foram indicadas e discutidas as características que distinguem os estados atréticos dos folículos pós-ovulatórios, em particular quando se trata de folículos mais velhos, mais facilmente confundíveis com estados avançados de atresia. Algumas das características importantes são a diferença na quantidade e aspecto do citoplasma visível, o facto de a camada folicular estar ou não intacta (uma abertura para o lúmen pode indicar a presença de um folículo que largou o oócito), entre outras.

Foram apresentadas imagens e lâminas com cortes histológicos de folículos pós-ovulatórios, em particular, de carapau, pescada e sardinha, e foram indicadas as

características que permitem datar estas estruturas: tamanho, forma, tipo de células que formam a granulosa e respectivos núcleos.

- **Estimação da fecundidade**

É de crucial importância o conhecimento do tipo de fecundidade de cada espécie – determinada ou indeterminada – pois é com base nesta característica intrínseca que se decide sobre a aplicação do método anual ou diário na sua determinação. A espécies com fecundidade determinada deve ser aplicado o método de produção de ovos anual (MPAO), com amostragens distribuídas ao longo da época de desova. Nesta metodologia é necessário determinar a fecundidade potencial, no início da época de desova, e o valor da atresia ao longo de toda a época. Para as espécies com fecundidade indeterminada deve aplicar-se o método de produção de ovos diário (MPDO), sendo necessário realizar uma amostragem no pico de desova. A fecundidade parcial deverá ser obtida a partir de 50-60 exemplares, sendo aconselhável amostrar 5 indivíduos das classes de comprimento mais abundantes (correspondentes à parte central da campânula da distribuição de comprimentos) e todos os que pertencerem às classes menores e maiores (correspondendo às caudas da distribuição).

- **Fracção de desova e MPDO**

Qualquer dos métodos de determinação da fracção de desova – núcleos migrados, oócitos hidratados ou folículos pós-ovulatórios – requer cuidados especiais na identificação destes estados de maturação dos oócitos. No primeiro método é necessário identificar correctamente os núcleos migrados, para que apenas sejam incluídos os oócitos com placas de vitelo situadas num dos lados do núcleo e distinguir bem o que são apenas gotas lipídicas dispersas no citoplasma. Finalmente, o método dos folículos pós-ovulatórios implica a sua datação nem sempre fácil em determinadas espécies, pois requer o conhecimento da hora de postura, o que no carapau, por exemplo, não é fixa, ocorrendo desova ao longo de todo o dia.

- **Ogivas de maturação**

Foi discutida a forma mais correcta de elaborar as ogivas de maturação, tendo sido colocada a questão, em particular no caso da pescada, se deverão ser feitas apenas com fêmeas ou com os dois sexos combinados. Tendo em conta o dimorfismo sexual desta espécie considera-se mais correcto ser uma ogiva combinada dos dois sexos. Considerou-

se ainda que só se deveria usar dados do início ao pico da época de postura de modo a evitar incluir os indivíduos em repouso como imaturos. No caso da pescada seria de Dezembro/Janeiro a Março. Foi também referido o problema de quando se tem épocas de postura extensas não se considerar o crescimento dos indivíduos.

► **Apresentações e documentos de trabalho**

Foram feitas várias apresentações sobre trabalhos realizados com base na histologia de gónadas, dos quais se apresentam os títulos e respectivos abstracts.

**Costa, A. M., 2006 – “Descrição das técnicas de processamento de amostras para inclusão em parafina”**

**Abstract:** As técnicas de inclusão em parafina desenvolvem-se em seis etapas: Preparação das cassetes, Desidratação, Inclusão, Cortes, Coloração e Montagem. A apresentação destas etapas é feita por meio de fotografias, acompanhadas de um pequeno texto explicativo (Anexo 2 – I).

**Costa, A. M., 2006 – “Aplicação da histologia aos estudos de reprodução do carapau”**

**Abstract:** A histologia é a ferramenta de trabalho que serve de base aos estudos de biologia de reprodução do carapau. É com base nestas técnicas que se elaboram a escala de maturação microscópica, que irá validar a escala macroscópica, as ogivas de maturação microscópicas, se determina a fracção de desova e a hora de postura e se eliminam as amostras erradamente recolhidas para a fecundidade parcial. Apresenta-se a escala de maturação microscópica, com uma breve descrição de cada estado de maturação, as ogivas de maturação por comprimento e idade e explica-se como a histologia serve de base à determinação da fracção de desova e hora de postura. Finalmente mostra-se ainda o papel importante destas técnicas na determinação da fecundidade parcial (Anexo 2 – II).

**Costa, A. M., Pissarra, J. and Murta, A., 2003 – “Horse Mackerel maturity stages review (1992-2002) in the ICES Division IXa (Portugal and Gulf of Cadiz)”**

**Abstract:** Significant differences have been observed between data on maturity stages identification from macroscopic and microscopic analysis of horse mackerel ovaries.

Microscopic data were used to check and control the quality of the macroscopic observations.

Comparison of microscopic maturity stages distribution pattern shows a large dominance of stage 3 during the spawning season and a dominance of stage 5 in the non-spawning season.

Maturity stages distribution during the spawning season, with high proportions of stages 3 and 5, suggests that after a pre-spawning stage 3 females pass through a quick stage 4 to a stage 5 and after that they return again to a stage 3 and starts new batch cycles. This mechanism suggests that there is no microscopic difference between pre-spawning stage 3 ovaries and the subsequent stages 3 observed during the spawning season.

The observed continuous distribution of the oocyte's diameters suggests that horse mackerel is not a determinate spawner.

The evolution of the maturity stages distribution during the spawning season from the period 1992-95 to the recent period 1998-2002 suggests a significative displacement in the horse mackerel spawning season (Anexo 2 – III).

**Gonçalves, P., Costa, A. M. and Cunha, M. E., 2003 – “Horse-mackerel (*Trachurus trachurus*, L. 1758) have a Determinate or Indeterminate fecundity?”**

**Abstract:** The reproductive strategy of horse mackerel was studied by comparing the variation of the total number of oocytes during the spawning period at three different periods (beginning, middle and ending). It was observed an increase of the total number of oocytes during the spawning season as well as the mean number of total oocytes by unit of area (cm<sup>2</sup>). The mean radius (µm) of oocytes along the spawning season showed a decrease. According to these results horse mackerel is probably an indeterminate spawner (Anexo 2 – IV).

**Gonçalves, P., Costa, A. M. and Murta, A., 2006 – “MPDO aplicado ao carapau”**  
(Em publicação)

**Gonçalves, P., 2006 – “Congelação e refrigeração vs Histologia”**

**Abstract:** Foram comparadas as fotografias de preparações histológicas realizadas em gónadas fixadas em fresco, com as de gónadas congeladas antes da fixação. O

congelamento, devido à formação de cristais de gelo, tem como efeito o rebentamento das estruturas intracelulares não permitindo a identificação histológica dos estados de maturação. Foi também estudado o efeito da refrigeração nas amostras utilizadas para histologia. As gónadas foram fixadas após períodos de 12h, 24h e 36h de refrigeração. A observação microscópica das gónadas sujeitas a refrigeração não revelou nenhuma alteração das estruturas celulares, tendo sido possível identificar os estados de maturação microscópicos nestas. Os resultados obtidos permitiram concluir que para a atribuição de estados de maturação microscópicos podem ser utilizadas gónadas fixadas em fresco (preferencialmente) ou refrigeradas até um período de 36h. Sendo de salientar que no caso das amostras recolhidas para datação de folículos pós-ovulatórios apenas se devem utilizar amostras fixadas em fresco (Anexo 2 – V).

**Gonçalves, P., 2006 – “Escala de Maturação da Pescada (*Merluccius merluccius*)”**

**Abstract:** Neste trabalho foi apresentada a escala de maturação macroscópica de 5 estados baseada em critérios microscópicos. Esta escala resultou da redução da escala de 10 estados que até 2003 foi utilizada na amostragem biológica da pescada. O facto da escala de 5 estados a nível macroscópico apresentar características subjectivas na classificação entre pré-postura e postura levou-nos a converter estes dois estados num estado único, tendo como resultado uma escala com 4 estados. A observação histológica de indivíduos classificados macroscópicamente como imaturos, revelou a presença de indivíduos em repouso. Estes indivíduos apesar de macroscópicamente não apresentarem características distintas dos imaturos, microscópicamente é possível distingui-los. Actualmente a escala de maturação macroscópica da pescada é constituída por 4 estados. No entanto, a escala microscópica apresenta 5 estados, correspondendo o 5º estado ao repouso (Anexo 2 – VI).

**Morgado, C., 2006 – “Importância dos dados de reprodução na avaliação de stocks. Exemplo: Pescada”**

**Abstract:** A estimação da biomassa do stock desovante é fundamental na avaliação do estado de conservação de um stock, por modelos estruturais, como é o caso do stock Sul de pescada (Divisões VIIIc e IXa do ICES). Para essa estimação é necessária a aplicação de ogivas de maturação. A ogiva de maturação de pescada obtém-se com base nos dados do estado de maturação de indivíduos amostrados por análise macroscópica. No âmbito do projecto PNAB- Recolha de Dados realizou-se uma validação da escala macroscópica com

base em histologia. Verificou-se que de seis pescadas, capturadas na época de reprodução, classificadas macroscopicamente como imaturas, três eram maduras em repouso. Este tipo de erro – classificar erradamente indivíduos maduros como imaturos – pode provocar uma subestimação do stock desovante. Este trabalho pretende realçar a histologia como forma de validação dos dados usados por rotina para a estimação da ogiva de maturação (Anexo 2 – VII).

**Nunes, C., 2006 – “Tempo de espera entre a captura da sardinha e a fixação das gónadas”**

**Abstract:** Em 2005, no contexto da amostragem do MPDO (sobretudo no que respeita às amostras provenientes da frota comercial), foi investigada a questão do tempo de espera entre a captura da sardinha e a fixação das gónadas, podendo essa duração excessiva comprometer a correcta datação dos FPOs presentes nas gónadas e a posterior estimação da fracção de desova. Durante o cruzeiro do MPDO de 2005, foram amostradas 30 fêmeas de sardinha logo após a captura, e 4h, 8h e 12h após a sua captura (durante esses intervalos de tempo, a sardinha foi guardada na câmara fria). As gónadas foram posteriormente analisadas histologicamente, não tendo sido notadas diferenças significativas entre as amostras (Anexo 2 – VIII).

**Nunes, C., 2006 – “Fixador usado para as gónadas de sardinha”**

**Abstract:** A observação histológica das amostras de gónadas de sardinha recolhidas no contexto do MPDO de 2005 mostrou que os oócitos sistematicamente apresentavam os núcleos pouco ou nada visíveis. Após se ter eliminado outras causas possíveis, decidiu-se investigar o efeito do tipo de fixação utilizado (todas essas amostras tinham sido conservadas em formol salino). Foram testadas 4 condições de fixação diferentes (formol tamponado ou não tamponado, diluído com água do mar ou água destilada), tendo os resultados preliminares sugerido que a água do mar poderá interferir no processo de fixação desses tecidos, sendo portanto aconselhável usar a água destilada no caso da sardinha (Anexo 2 – IX).

**Nunes, C., 2006 – “Histologia de gónadas de sardinha”**

**Abstract:** Foram apresentados os principais objectivos da observação histológica de gónadas de sardinha, actualmente: a validação da escala de maturação macroscópica, a correcta separação dos indivíduos maduros e imaturos (para a obtenção das ogivas de

maturação), a identificação e datação dos FPOs (para eliminação das fêmeas hidratadas com FPOs do cálculo da fecundidade parcial e para o cálculo da fracção desovante no MPDO) e a avaliação da incidência dos vários tipos de atresia nas gónadas (indicativa do fim da época de desova e/ou de condições fisiológicas adversas). Foram descritos os critérios utilizados na classificação dos estados de maturação, na datação dos FPOs e na identificação dos vários tipos de atresia (Anexo 2 – X).

**Pereira, B. S., 2006 – “Histologia de estruturas do sistema reprodutivo em quatro espécies de raias”**

**Abstract:** As raias são espécies ovíparas cuja fecundidade está dependente da capacidade ovárica e uterina. Os embriões desenvolvem-se no interior de uma cápsula de origem proteica. Esta cápsula é produzida pela glândula oviducal que também tem funções de armazenamento de esperma e produção da geleia. É geralmente assumido que a postura ocorre ao longo de todo o ano, mas ainda persistem muitas dúvidas se este comportamento é realmente seguido por todas as espécies. Face a estas dúvidas, torna-se importante a realização de estudos, auxiliados por análises histológicas, que visem a estimação da fecundidade e a delimitação de períodos de maturação, cópula e postura, por espécie. Em 2003 foram iniciados estudos, que ainda se encontram em desenvolvimento, sobre a biologia reprodutiva de 4 espécies de raia, *Raja clavata*, *R. brachyura*, *R. montagui* e *Leucoraja naevus*. Foram utilizadas duas técnicas de histologia, parafina e resina, para analisar diferentes estruturas do aparelho reprodutivo. A análise dos ovários visa a detecção de folículos pós-ovulatórios e de folículos em atresia, de modo a distinguir microscopicamente os estados em maturação, regressão e repouso. O estudo da glândula oviducal foi desenvolvido para analisar as diferentes zonas: *club*, *papillary*, *baffle* e *terminal*, em fêmeas em diferentes estados de maturação. A análise da microestrutura do testículo permite a identificação das diferentes fases da espermiogénese para validação da escala macroscópica. Actualmente, o estudo sobre o útero e os ductos espermáticos está numa fase preliminar (Anexo 2 – XI).

**Moura, T., Figueiredo, I., Neves, A. e Gordo, L., 2006 – “Aplicação da histologia ao estudo da biologia reprodutiva de tubarões de profundidade”**

**Abstract:** Actualmente, e devido à ruptura dos stocks pelágicos e demersais tradicionais, os tubarões de profundidade constituem uma componente importante dos desembarques

comerciais na Europa e em Portugal. Os tubarões de profundidade em estudo no IPIMAR, dos quais se destaca *Centroscymnus coelolepis*, são espécies vivíparas lecitotróficas, em que os embriões se desenvolvem no interior do útero materno e dependem exclusivamente das reservas de vitelo. De entre os principais órgãos reprodutivos femininos, destacam-se a glândula oviducal e o útero, que desempenham importantes funções no ciclo reprodutivo, durante o qual sofrem modificações estruturais e fisiológicas. A aplicação da histologia no estudo da biologia reprodutiva de tubarões de profundidade tem como objectivos validar a escala de maturação macroscópica assim como estudar a evolução e diferenciação dos órgãos reprodutores, como a glândula e o útero, ao longo do ciclo reprodutivo. A glândula oviducal é responsável pela produção de membranas que vão envolver o ovo. Esta estrutura diferencia-se no início do processo de maturação e atinge a largura máxima na ovulação, período após o qual regride. É formada por um conjunto de túbulos secretores que vão acumulando produtos que são canalizados para o lúmen, onde vão envolver o ócito aquando a sua passagem. Os túbulos abrem entre prolongamentos da parede glandular, as lamelas, cujo epitélio secretor poderá ter a função de secreção de produtos lubrificantes. No útero, durante o processo de maturação, a parede interna apresenta projecções, as vilosidades, cujo epitélio apresenta características secretoras e de transporte de substâncias. As trocas embrião/progenitora são evidentes devido ao aumento da irrigação e a diminuição da espessura do epitélio nas fases finais da gestação (Anexo 2 – XII).

#### **Gonçalves, P., 2007 – “HAKE – State of the ART”**

**Abstract:** A escala de maturação microscópica actualmente utilizada para a pescada (*Merluccius merluccius*) é composta por 5 estados. Apresentam-se as principais características de cada um dos estados. A importância da histologia na distinção entre as fêmeas em estado imaturo das em repouso é referida, dado que macroscopicamente estas não se conseguem distinguir. A aplicação da histologia na classificação do estado de maturação para machos encontra-se em fase de desenvolvimento, salientando-se as dúvidas existentes. Sendo a pescada uma espécie em que a idade da primeira maturação difere entre machos e fêmeas, questiona-se qual o tipo de ogiva a aplicar: uma só de fêmeas ou de sexos combinados (Anexo 2 – XIII).

**Costa, A. M., 2007 – “HORSE MACKEREL – State of the ART”**

**Abstract:** Apresenta-se a descrição das características microscópicas dos estados de maturação das gónadas femininas e masculinas de carapau, salientando-se as dúvidas que existem na identificação dos machos. Refere-se a aplicação da identificação histológica das fêmeas na avaliação (ogivas de maturação) e no MPDO (fecundidade parcial e fracção de desova). Discute-se qual a melhor metodologia a aplicar na determinação da fracção de desova e os problemas inerentes em particular à aplicação do método dos FPOs (Anexo 2 – XIV).

**Nunes C.; Silva, A.; Soares, E.; Gantias, K. e Stratoudakis, Y., 2007 –  
“Histologia aplicada às gónadas de sardinha”**

**Abstract:** A histologia é utilizada no estudo da reprodução da sardinha de forma regular desde o fim dos anos 90, sobretudo como ferramenta de análise no âmbito da avaliação do recurso, usando o Método de Produção Diária de Ovos (DEPM). Nesse contexto, foram desenvolvidas ao longo dos últimos anos metodologias que pretendem validar e otimizar a determinação dos vários estados de maturação dos ovários, a identificação e datação dos folículos pós-ovulatórios (POFs) e a avaliação da incidência nos ovários dos vários estados de atresia. Essas diferentes metodologias foram apresentadas neste Workshop e salientaram-se as principais dificuldades encontradas, nomeadamente: na inequívoca distinção entre indivíduos virgens e indivíduos em repouso, e na correcta identificação dos estados atréticos mais tardios (Anexo 2 – XV).

**Pereira, J., 2007 – “Squid fecundity – females”**

**Abstract:** As estimativas de fecundidade da lula no IPIMAR resumem-se a ensaios recentes, sem carácter de regularidade ou objectivos de monitorização. As primeiras fases do trabalho centraram-se na tentativa de identificação e caracterização dos estádios de desenvolvimento dos oócitos e identificação de POFs. Numa primeira abordagem de análise pretendeu-se potenciar a utilização de colecções históricas de gónadas mantidas em armazém ao longo de quase duas décadas, para a determinação de uma série temporal de fecundidades. A análise destas gónadas por comparação com gónadas “frescas” acabou por revelar que as primeiras padecem de problemas de tratamento na recolha (congelamento), o que dificulta mas parece não impossibilitar em definitivo a sua utilização para determinações da fecundidade (Anexo 2 - XVI).

**Pereira, B. S., 2007 – “Histology analysis – rays species reproduction”**

**Abstract:** As raias são espécies ovíparas. Os embriões desenvolvem-se no interior de uma cápsula de origem proteica, produzida pela glândula oviducal. Em 2003 foram iniciados estudos, que ainda se encontram em desenvolvimento, sobre a biologia reprodutiva de 5 espécies de raia: *Raja clavata*, *R. brachyura*, *R. montagui*, *R. undulata* e *Leucoraja naevus*. A determinação dos estados de maturação e da fecundidade são realizados nestas espécies à macro escala. Existem problemas com a congelação de amostras e com a fixação, dada a dimensão das estruturas conservadas. A análise histológica é aplicada para compreender determinados fenómenos, não detectadas na macro escala: presença de corpos atréticos e folículos pós-ovulatórios (ovários), presença de secreções e espermatóforos (glândula oviducal) e desenvolvimento dos espermatocistos (testículos) (Ver Anexo 2 – XI).

**Macewicz, B. – “Histological classifications of the pacific sardine (*Sardinops sagax*) ovary” – Poster**

**Abstract:** A classificação dos estados de desenvolvimento do ovário de *Sardinops sagax* é baseada na da anchova (*Engrulis mordax*), sendo realçadas as diferenças entre as duas espécies. A análise histológica dos ovários de *S. sagax* aplica-se na determinação da maturação, estados atréticos, fracção de desova e fecundidade parcial. São referidas as características das fêmeas maduras e activas; a metodologia para a determinação da fecundidade parcial e da fracção de desova, esta baseada em quatro critérios histológicos da identificação dos folículos pós-ovulatórios (Anexo 2 – XVII).

**Valentim, M. F., 2007 – “Reproductive aspects of toad-fish *Lophius lastrophysus* landed in Rio de Janeiro State – Brazil”**

**Abstract:** A escala de maturação macroscópica do tamboril capturado na área de Niterói, Brazil (*L. gastrophysus*) apresenta 7 estados. Neste trabalho faz-se a análise do aspecto microscópico das gónadas para aperfeiçoar a escala macroscópica e posteriormente confirmar a semelhança histológica entre esta espécie e outras do género *Lophius*, determinar o período de desova e estimar os parâmetros de reprodução. Apresentam-se também os valores do índice gonadossomático (IG) e hepatossomático (IH) para os estados de maturação 5 e 6. (Anexo 2 – XVIII)

Foram ainda mostradas duas imagens de **cortes histológicos de gónadas de tamboril** (Anexo 2 – XIX) e foi discutida a importância da colocação na cassete da peça que vai ser incluída, visto que as gónadas de tamboril têm uma estrutura interna bastante diferente da dos outros peixes. O aspecto dos dois cortes, um na posição correcta e o outro na posição incorrecta, foi comentado pela **Maria do Carmo Silva**.

Dois posters subordinados aos temas “**Microscopic Maturity Cycle of Females for Horse Mackerel (*Trachurus trachurus*)**”, de Ana Maria Costa e Patrícia Gonçalves (Anexo XX) e “**Microscopic Females Maturity Stage Key for the European Hake (*Merluccius merluccius*)**”, de Patrícia Gonçalves (Anexo XXI) foram também comentados.

#### ► **Adenda ao programa do workshop**

Após o cumprimento de todos os pontos agendados na programação do workshop (Fase I) e pelo facto de haver ainda tempo disponível até ao final da reunião, foi sugerido por alguns dos participantes e aceite pela coordenadora, que se falasse um pouco sobre fecundidade, que é um tema intimamente relacionado com histologia.

Neste âmbito foram abordadas as seguintes questões:

- Tipos de fecundidade: determinada e indeterminada
- O que caracteriza cada uma
- A que tipo correspondem as espécies referidas no workshop
- Como deve ser feita a amostragem dirigida a cada uma delas
- Como é feito o tratamento dos resultados
- Fecundidade dos cefalópodes

Estas questões foram explicadas pelos participantes que trabalham mais directamente nesta linha de actividade – Ana Maria Costa, Patrícia Gonçalves e Cristina Nunes – tendo os restantes participantes mostrado interesse neste tema e posto algumas questões que foram esclarecidas. O Dr. João Pereira e a estagiária Joana Portugal falaram sobre o tipo de fecundidade dos cefalópodes, em particular das lulas, e os problemas que se lhes deparam na sua determinação devido à curta vida desta espécie e ao ainda pouco conhecimento da melhor metodologia a aplicar.

Um outro ponto que estava fora da agenda de trabalhos mas igualmente ligado ao tema da reunião foi a apresentação, por Bárbara Pereira, de uma escala de maturação única aplicável a todas as espécies, subordinada ao tema **“Phases of the reproductive cycle”**, que havia sido apresentada na “3rd. Workshop on Gonadal Histology of Fishes” realizada a 11 e 12 de Julho de 2006 em New Orleans, USA (Anexo 2 – XXII).

No âmbito do workshop e incluída no ciclo de palestras do IPIMAR, B. Macewicz apresentou no auditório o trabalho subordinado ao tema **“Fish Reproduction Research at the Southwest Fisheries Science Center”** (Anexo XXIII).

#### ► **Recomendações**

Os participantes neste workshop realçaram a importância dos seguintes pontos para a obtenção de resultados mais correctos nos estudos que envolvem histologia de gónadas:

- (1) Os arrastos feitos durante a noite evitam a fuga à rede, visto que o peixe não vê a arte de pesca.
- (2) Para as espécies que efectuam grandes migrações verticais durante a noite devem fazer-se arrastos mesmo à superfície e não a meia água como são normalmente realizados os arrastos pelágicos.
- (3) Nas espécies em que a recolha de amostras ocorre durante as 24 horas do dia, caso, por exemplo, da anchova amostrada em águas espanholas, é necessário delimitar as horas que se devem considerar para obter a fracção de desova e não incluir todos os indivíduos capturados.
- (4) É aconselhável fazer anualmente uma calibração da atribuição dos estados de maturação macroscópicos dados pelos diversos amostradores de cada espécie, com uma amostragem específica para esta calibração.
- (5) Quando se coloca a gónada no frasco deve-se ter atenção para que não fique encostada à parede, o que impede uma boa preservação dessa parte dos tecidos e pode fazer com que na observação dos cortes pareça uma gónada com atrésia.
- (6) A gónada deve ser fixada inteira (para evitar perda de oócitos) e o volume do fixador deverá ser 5 a 6 vezes superior ao volume da gónada. No entanto, em casos de gónadas muito grandes pode optar-se por separar e fixar os dois lobos individualmente.

- (7) As gónadas poderão ser passadas para álcool algum tempo depois de recolhidas se isso facilitar o seu manuseamento, mas se o tempo que medeia entre a recolha e o processamento for longo é preferível mantê-las em formol pois o álcool seca muito os tecidos.
- (8) As amostras destinadas a estudos de histologia devem ser frescas, podendo em certos casos, dependendo do objectivo a atingir, serem apenas refrigeradas. Se for necessário utilizar a congelação como método de fixação, esta só deve ser feita por CO<sub>2</sub> ou com isopentano arrefecido a – 165° C em azoto líquido (congelação brusca), como referido por Ravasco (1989).
- (9) O tipo de fixador (formol com água da torneira, salino, neutro, tamponado, etc.) deve ser o apropriado para cada espécie.
- (10) As amostras devem ser fixadas imediatamente após a sua recolha, especialmente se o objectivo da histologia forem estudos de fecundidade (em particular fracção de desova).
- (11) Visto que todos os processos de desenvolvimento das gónadas são contínuos além da observação de todas as características indicadas deve sempre ter-se em atenção a época em que foi feita a amostragem, pois a presença de folículos pós-ovulatórios ou atresia podem ter graus de importância diferentes conforme sejam indivíduos obtidos no início ou no fim da época de desova.
- (12) Se o objectivo da análise das lâminas for datação de folículos devem fazer-se cortes sequenciais (denominados cortes “em ténia”) e colocá-los por ordem na mesma lâmina, de forma a identificar o estado degenerativo do folículo, visto que um corte na sua parte central permite uma melhor descrição do grau de degeneração das suas estruturas quando comparado com um corte que apanhe apenas a sua superfície.
- (13) Se o objectivo do estudo incluir contagem de oócitos os cortes devem ser suficientemente separados de modo a não cortar o mesmo oócito nos vários cortes.
- (14) Ao aplicar o MPDO deve ter-se em atenção que a presença de folículos pós-ovulatórios “velhos” (estado avançado de degeneração) em indivíduos com oócitos hidratados não os exclui na determinação da fecundidade parcial, pois são indicadores de uma desova que terá ocorrido há já 2 ou 3

dias (dependendo da espécie) e que a fêmea poderá voltar a desovar nas próximas horas. Pelo contrário, a presença de folículos pós-ovulatórios “novos” impede a inclusão dessas fêmeas na determinação da fecundidade.

- (15) Na aplicação do MPAO só se devem contar os estados recentes de  $\alpha$  atresia, a qual deve ser contabilizada em todos os estados de desenvolvimento dos oócitos porque se só se contar nos oócitos em vitelogénese perde-se a informação do início da época de desova.
- (16) Sempre que possível os cortes devem ser bastante finos (2-3  $\mu$ m) para maior nitidez na sua observação.
- (17) A faca do micrótomo não pode ter bocas, devendo ser deslocada progressivamente de modo a estar sempre bem afiada.
- (18) A utilização de parafina ou resina como meio de inclusão dos blocos dependerá do tipo de material; estruturas grandes ou com maior resistência devem ser incluídas em resina, tal como quando se pretende observar estruturas para as quais é necessária uma observação mais detalhada.
- (19) As temperaturas da parafina e do banho-maria não devem ser demasiado altas, uma vez que podem destruir as estruturas internas da gónada; também a temperatura ambiente deve ser a adequada para o trabalho que está a decorrer.
- (20) Os tempos de coloração dos cortes devem ser ajustados para cada espécie.
- (21) Quando começamos a trabalhar com espécies novas devemos fazer a distribuição de comprimentos dos diâmetros dos oócitos para saber qual o tipo de fecundidade da espécie e em consequência qual a metodologia a aplicar. Espécies com uma distribuição de diâmetros descontínua terão fecundidade determinada, enquanto que uma distribuição contínua é indicadora de fecundidade indeterminada.
- (22) Os cortes devem ser sempre triados pelo técnico do laboratório antes de serem entregues ao responsável que os irá ler, para eliminação dos cortes defeituosos (com pregas, rasgões, mal corados, etc.).

#### ► **Questões a abordar futuramente**

Devido à falta de tempo e por não terem sido agendadas, ficaram por discutir neste workshop as seguintes questões:

- √ O que é que acontece aos indivíduos que estão a amadurecer durante a época de desova; desovam nesse ano ou no ano seguinte?
- √ Qual o tempo que medeia entre a vitelogénese e a desova?
- √ Será prática corrente nos outros Institutos de investigação estrangeiros a passagem das gónadas fixadas para álcool?
- √ Dever-se-ia fazer periodicamente a validação dos dados macroscópicos com cortes histológicos com o objectivo de manter uma correcta identificação dos estados de maturação atribuídos macroscopicamente?
- √ Seria possível obter uma escala de maturação única para todas as espécies e com um número mínimo de estados (4?) para facilitar a identificação?
- √ Porque será que os stocks Oeste e do Mar do Norte de carapau continuam a aplicar o Método de Produção de Ovos Anual quando existem tantos indicadores de que o carapau é uma espécie indeterminada e como tal o método mais correcto de determinar a fecundidade é o diário? Será possível que a mesma espécie tenha dois tipos de reprodução diferentes como forma de adaptação às condições ambientais? Em relação àqueles dois stocks não são conhecidos estudos que tentem provar o tipo de fecundidade do carapau das zonas mais a norte
- √ As ogivas de maturação devem ser feitas só com fêmeas ou com os dois sexos combinados? Será esta uma questão comum a todas as espécies ou poderá variar de uma espécie para outra?

Finalmente, foram indicados dois sites onde se podem trocar e recolher informações sobre histologia:

→ <http://research.myfwc.com/community>

→ <http://www.histosearch.com>

► Como resultado final deste workshop será elaborado um Manual de Histologia, com a descrição das técnicas de processamento de amostras de gónadas para histologia.

### ► Referências bibliográficas

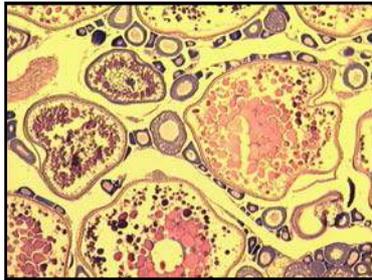
Foram referidos como sendo de interesse para os temas em discussão os seguintes artigos:

- ALHEIT, J.; ALARCON, V.H. e MACEWICZ, B., 1984. Spawning frequency and sex ratio in the peruvian anchovy, *Engraulis ringens*. *CalCOFI Rep.*, **25**: 43-52.
- CHEN, H.; LO, N. e MACEWICZ, B., 2003. MS Access programs for processing data from adult samples, estimating adult parameters and spawning biomass using Daily Egg Production method (DEPM). Administrative report LJ-03-14, 17 pp. + V Apêndices
- DICKERSON, T.; MACEWICZ, B. e HUNTER, J., 1992. Spawning frequency and batch fecundity of chub mackerel, *Scomber japonicus*, during 1985. *CalCOFI Rep.*, **33**: 130-140.
- GREER WALKER, M.; WITTHAMES, P.R. e BAUTISTA de Los SANTOS, 1994 – Is the fecundity of the atlantic mackerel (*Scomber scombrus*: Scombridae) determinate? *Sarsia*, 79: 13 – 26.
- HILL, K.T.; LO, N.C.H.; MACEWICZ, B.J. e FELIX-URAGA, R., 2006. Assessment of the pacific sardine (*Sardinops sagax caerulea*) population for U.S. management in 2007. NOAA-TM-NMFS-SWFSC-396, 105 pp.
- HUNTER, J. R.; MACEWICZ, B. J.; LO, N. C. H. e KIMBRELL, C. A., 1992. Fecundity, spawning and maturity of female Dover sole *Microstomus pacificus* with an evaluation of assumptions and precision. *Fish. Bull. U.S.* 90, 101-128.
- HUNTER, J.; MACEWICZ, B. e KIMBRELL, C.A., 1989. Fecundity and other aspects of the reproduction of sablefish, *Anoplopoma fimbria*, in central California waters. *CalCOFI Rep.*, **30**: 61-72.
- KJESBU, O.S.; HUNTER, J.R. e WITTHAMES, P.R., 2003. Report of the Working Group on Modern approaches to assess maturity and fecundity of warm and cold-water fish and squids. Bergen 2003, 139 pp.
- LASKER, R., 1985. An Egg Production Method for Estimation Spawning Biomass of Pelagic Fish: Application to the Northern Anchovy, *Engraulis mordax*. NOAA Technical Report NMFS 36, 99 pp.
- LO, N. C. H. e MACEWICZ, B., 2002. Spawning biomass of pacific sardine (*Sardinops sagax*) off California in 2002. Administrative Report LJ-02-40, 28 pp.

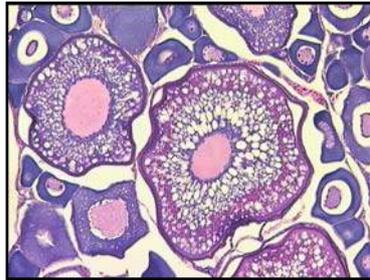
- LO, N. C. H. e MACEWICZ, B., 2004. Spawning biomass of pacific sardine (*Sardinops sagax*) off California in 2004 and 1995. Administrative Report LJ-04-08, 30 pp.
- LO, N. C. H. e MACEWICZ, B., 2006. Spawning biomass of pacific sardine (*Sardinops sagax*) off California in 2005. NOAA-TM-NMFS-SWFSC-387, 29 pp.
- LO, N. C. H.; MACEWICZ, B.; GRIFFITH, D. A. e CHARTER, R. L., 2007. Spawning biomass of pacific sardine (*Sardinops sagax*) off California in 2006., NOAA-TM-NMFS-SWFSC-401, 32 pp.
- MACEWICZ, B.J. e HUNTER, J.R., 1993. Spawning frequency and batch fecundity of jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, off California during 1991. *CalCOFI Rep.*, **34**: 112-121.
- MACEWICZ, B.J. e HUNTER, J.R., 1994. Fecundity of sablefish, *Anoplopoma fimbria*, from Oregon coastal waters. *CalCOFI Rep.*, **35**: 160-174.
- MACEWICZ, B.J., HUNTER, J.R., LO, N.C.H. e LaCASELLA, 2004. Fecundity, egg deposition and mortality of market squid (*Loligo opalescens*). *Fish. Bull.*, **102** (2): 306-327.
- PIRES, A.M., 1996. Estudo da gametogénese das espécies *Lophius bodegassa* Spinola, 1807 e *Lophius piscatorius* Linnaeus, 1758, da costa portuguesa. Relatório de Estágio do Curso de Biologia Marinha e Pescas. Universidade do Algarve, 41 pág.
- RAVASCO, J., 1989 – Relatório de Actividades no Estágio sobre Técnicas Histológicas de Histoquímica de microscopia electrónica, Histoenzimologia e Imunocitoquímica. Faculdade de Medicina de Lisboa, 95 pág.

## ANEXO 1

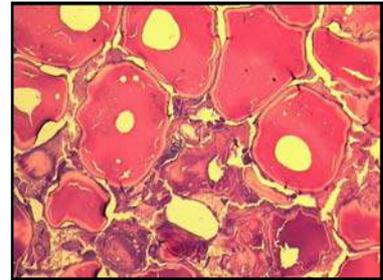
### **I – Gónadas congeladas e refrigeradas vs histologia (pescada) – Patrícia Gonçalves**



Fresca

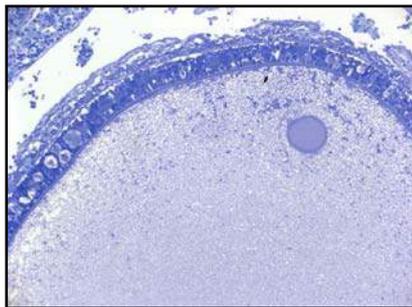


Refrigerada

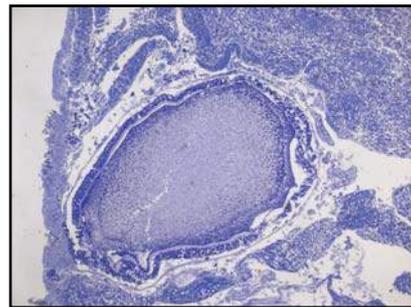


Congelada

### **II – Gónadas congeladas vs histologia (raias) – Bárbara Pereira**



Fresca



Congelada

### **III – Parafina vs resina – Bárbara Pereira**



Resina



Parafina

#### IV – Técnicas de inclusão em parafina – Ana Costa



Preparação das cassetes



Desidratação



Inclusão em parafina



Cortes



Coloração



Montagem

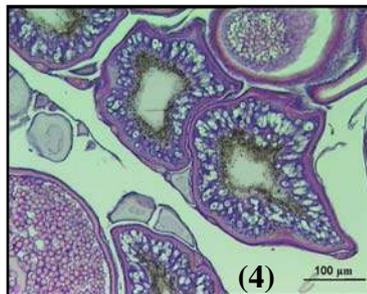
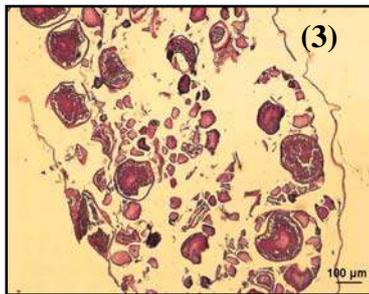
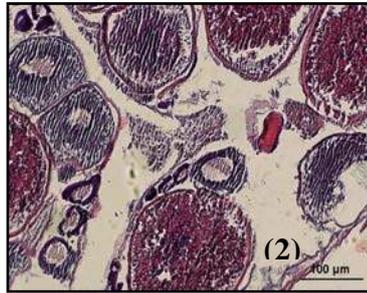
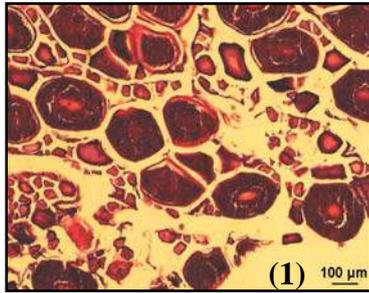
#### V – Maus cortes de sardinha (fixador) – Cristina Nunes



(1) Formol tamponado com Borax, diluído com água destilada a 4%

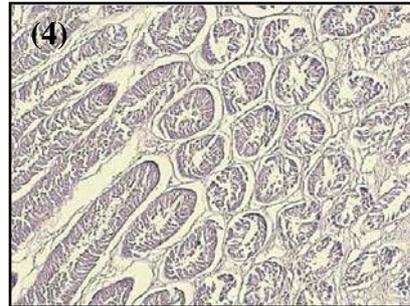
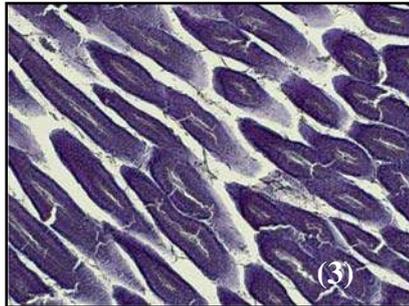
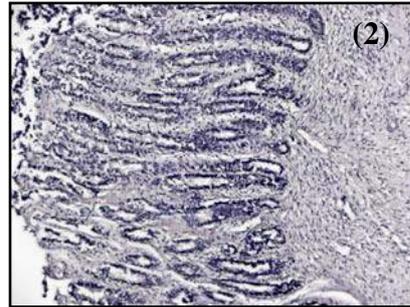
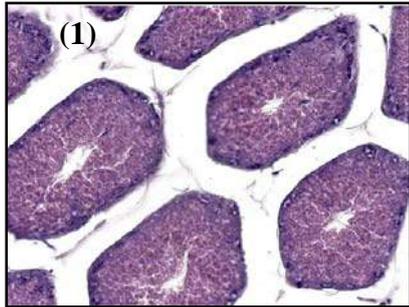
(2) Formol não tamponado, diluído com água do mar a 4%

## VI – Maus cortes de sardinha (diversos) – Cristina Nunes



- (1) Coloração excessiva
- (2) Problemas na faca
- (3) Estruturas rebentadas (temperatura da água do banho-maria muito elevada?)
- (4) Hematoxilina não filtrada

## VII – Maus cortes de raias (diversos) – Bárbara Pereira



- (1) Desidratação excessiva
- (2) Problema de coloração (ausência de eosina)
- (3) Problema de coloração (coloração excessiva)
- (4) Problema de coloração (coloração insuficiente)

## ANEXO 2 – APRESENTAÇÕES

- I** – “Descrição das técnicas de processamento de amostras para inclusão em parafina”  
– Costa, A. M., 2006
- II** – “Aplicação da histologia aos estudos de reprodução do carapau” – Costa, A. M.,  
2006
- III** – “Horse Mackerel maturity stages review (1992-2002) in the ICES Division IXa  
(Portugal and Gulf of Cadiz)” – Costa, A. M., Pissarra, J. and Murta, A., 2003
- IV** – “Horse-mackerel (*Trachurus trachurus*, L. 1758) have a Determinate or  
Indeterminate fecundity?” – Costa, A. M., Cunha, M. E. and Gonçalves, P.,  
2003
- V** – “Congelação e Refrigeração vs Histologia” – Gonçalves, P., 2006
- VI** – “Escala de Maturação da Pescada (*Merluccius merluccius*)” – Gonçalves, P., 2006
- VII** – “Importância dos dados de reprodução na avaliação de stocks. Exemplo: Pescada”  
– Morgado, C., 2006
- VIII** – “Tempo de espera entre a captura da sardinha e a fixação das gónadas” – Nunes,  
C., 2006
- IX** – “Fixador usado para as gónadas de sardinha” – Nunes, C., 2006
- X** – “Histologia de gónadas de sardinha” – Nunes, C., 2006
- XI** – “Histologia de estruturas do sistema reprodutivo em quatro espécies de raias” –  
Pereira, B. S., 2006
- XII** – “Aplicação da histologia ao estudo da biologia reprodutiva de tubarões de  
profundidade” – Moura, T., Figueiredo, I., Neves, A. e Gordo, L., 2006
- XIII** – “HAKE – State of the ART” – Gonçalves, P., 2007
- XIV** – “HORSE MACKEREL – State of the ART” – Costa, A. M., 2007
- XV** – “Histologia aplicada às gónadas de sardinha” – Nunes C.; Silva, A.; Soares, E.;  
Ganias, K. e Stratoudakis, Y., 2007
- XVI** – “Squid fecundity – females” – Pereira, J., 2007
- XVII** – “Histological classifications of the pacific sardine (*Sardinops sagax*) ovary”  
(Poster) – Macewicz, B.
- XVIII** – “Reproductive aspects of toad-fish *Lophius lastrophysus* landed in Rio de Janeiro  
State – Brazil” – Valentim, M. F., 2007
- XIX** – “Importância da colocação das gónadas de tamboril (*Lophius piscatorius*) nas  
cassetes de inclusão para histologia” – Silva, C., 2007

- XX** – “Microscopic Maturity Cycle of Females for Horse Mackerel (*Trachurus trachurus*)” (Poster) – Costa, A. M. e Gonçalves, P., 2007
- XXI** – “Microscopic Females Maturity Stage Key for the European Hake (*Merluccius merluccius*)” (Poster) – Gonçalves, P., 2007
- XXII** – “Phases of the reproductive cycle” – Apresentado por Pereira, B. S., 2006
- XXIII** – “Fish Reproduction Research at the Southwest Fisheries Science Center” – Macewicz, B., 2007

## ANEXO 2 – I

“Descrição das técnicas de processamento de amostras para inclusão em parafina” – Costa, A. M., 2006

A microscopic image of fish gill tissue, showing numerous gill arches with primary and secondary lamellae. The tissue is stained with hematoxylin and eosin (H&E), highlighting the cellular structure and the vascular spaces within the lamellae.

NEOMAR

COMISSÃO EUROPEIA

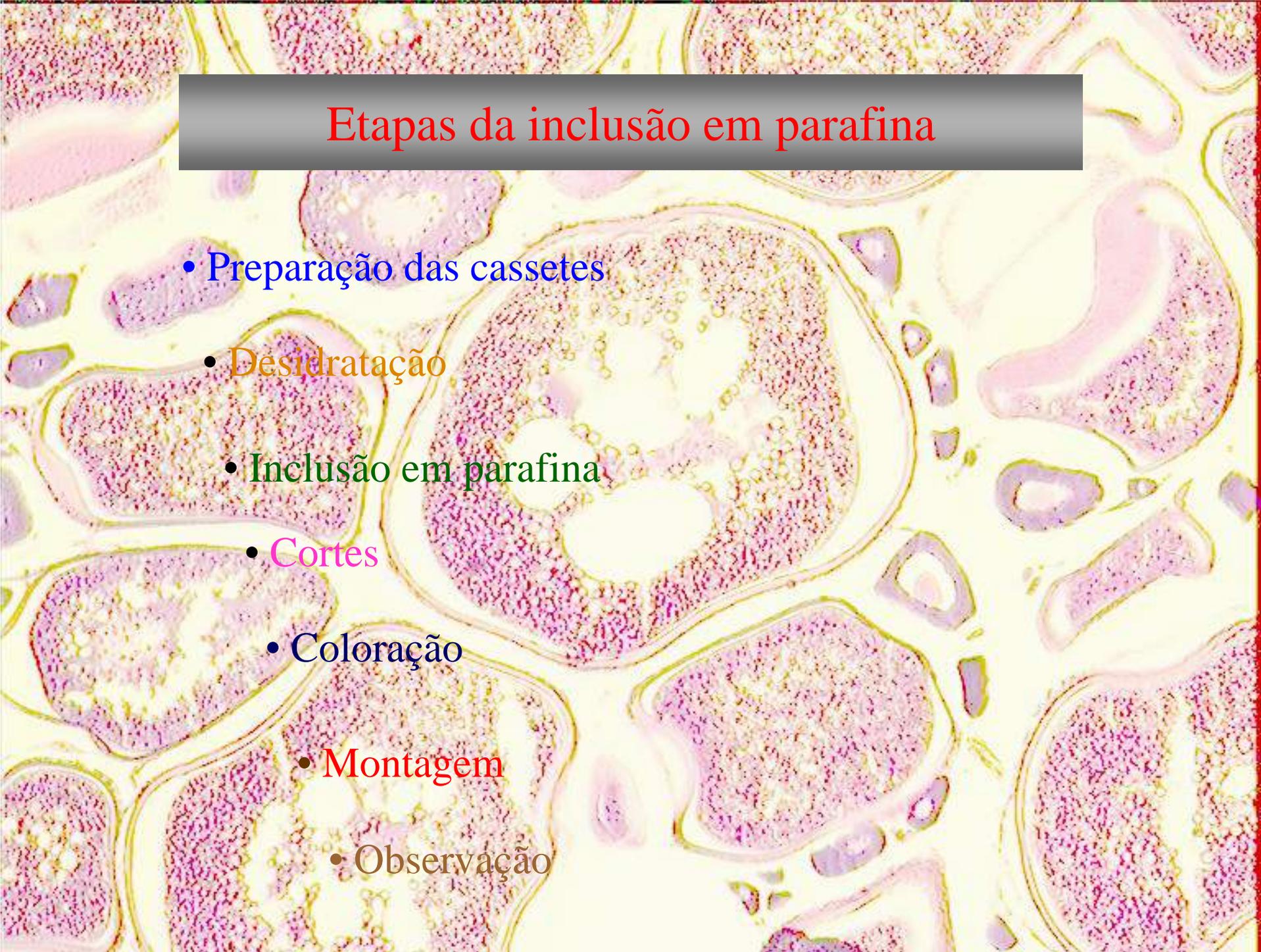
Fundos Estruturais



## Processamento de amostras para histologia

**Ana Maria Costa**

Workshop de Histologia, IPIMAR, 22-23 de Novembro de 2006



## Etapas da inclusão em parafina

- Preparação das cassetes
- Desidratação
- Inclusão em parafina
- Cortes
- Coloração
- Montagem
- Observação

# Preparação das cassetes



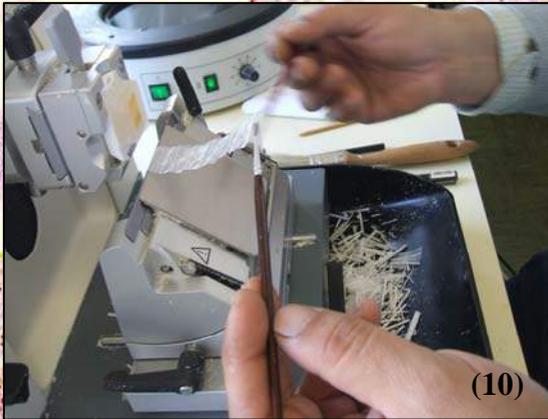
# Desidratação



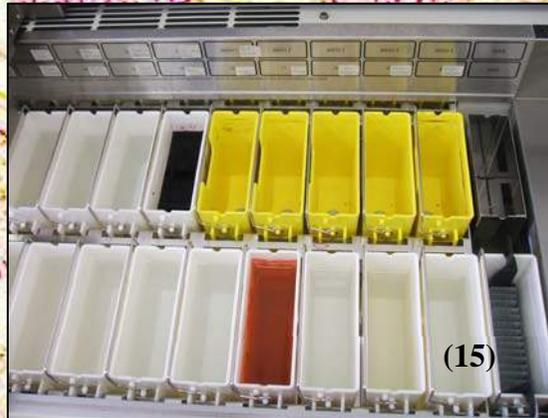
# Inclusão em parafina



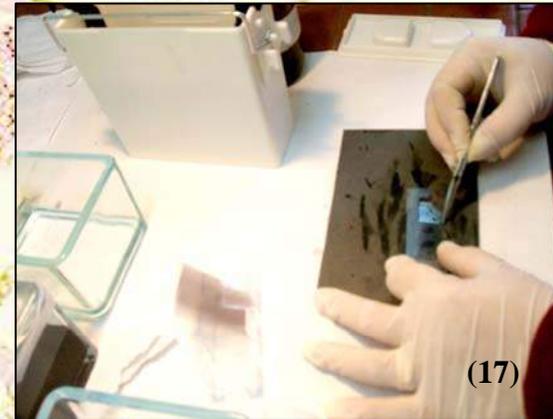
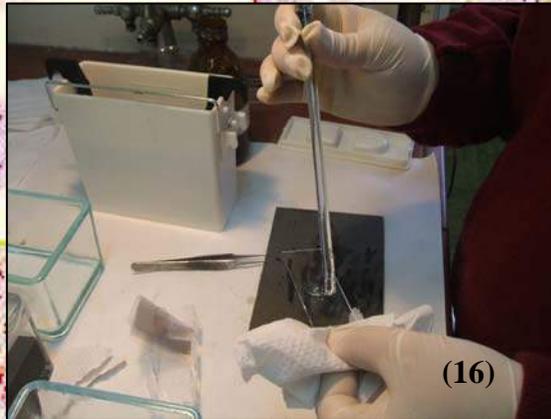
# Cortes



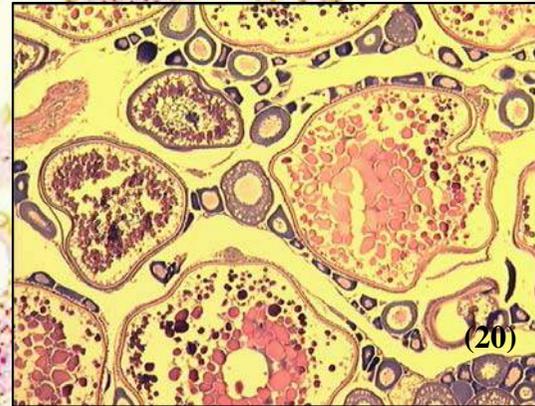
# Coloração



# Montagem



# Observação



## ANEXO 2 – II

“Aplicação da histologia aos estudos de reprodução do carapau” – Costa, A.  
M., 2006



COMISSÃO EUROPEIA

Fundos Estruturais



# Aplicação da histologia aos estudos de reprodução do carapau

**Ana Maria Costa**

Workshop de Histologia, IPIMAR, 22-23 de Novembro de 2006

A histologia pode servir de base para a determinação de:

❖ Escala de maturação microscópica

❖ Fracção de desova

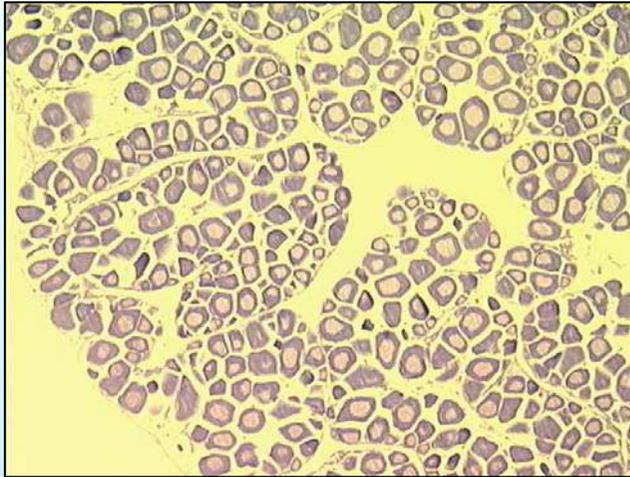
❖ Fecundidade parcial

❖ Ogivas de maturação

❖ Hora de postura

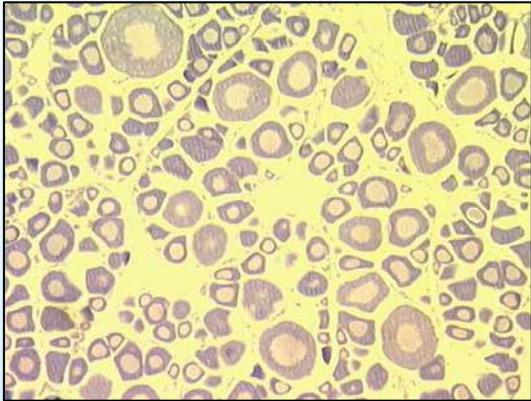
## Escala de maturação

### Estado 1. Imaturo



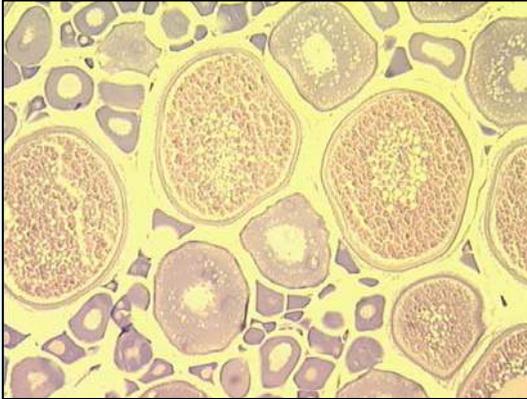
- Oócitos pequenos, não vitelados
- Septos ováricos bem definidos
- Sem folículos nem estados de atresia

## Estado 2. Início da maturação / Final da recuperação

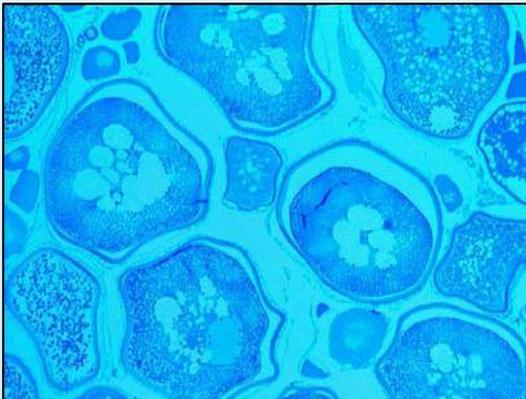


- Oócitos primários com um grande núcleo
- Alguns oócitos em início de vitelogénese
- Quando em recuperação podem ser visíveis FPOs ou estados atréticos

### 3. Final do desenvolvimento



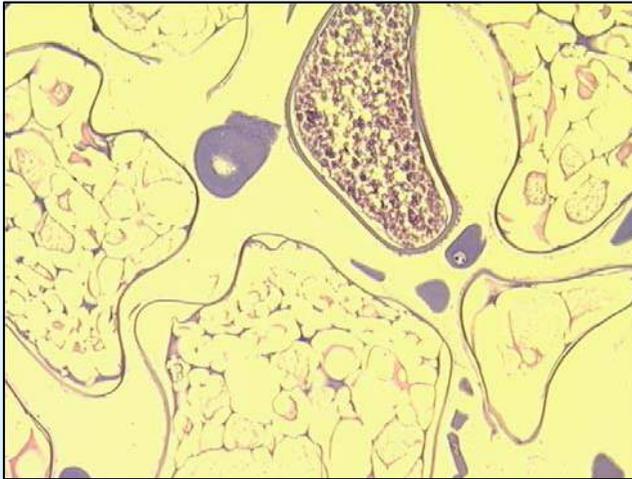
- A maior parte dos oócitos encontra-se em vitelogénese



- Na fase mais avançada as gotas lipídicas agrupam-se formando placas situadas de um dos lados do núcleo

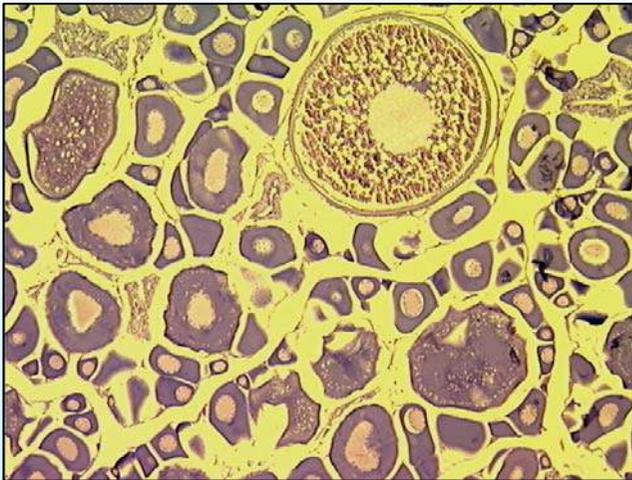
- Sem folículos nem atresia

## 4 - Maduro



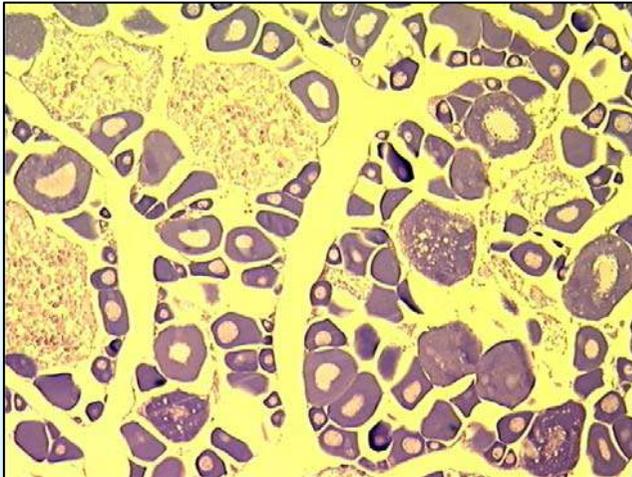
- Grande quantidade de oócitos hidratados, embora misturados com outros oócitos vitelados

## 5 - Esgotado



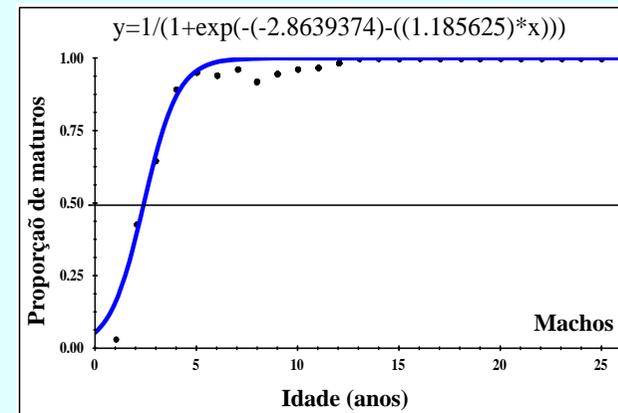
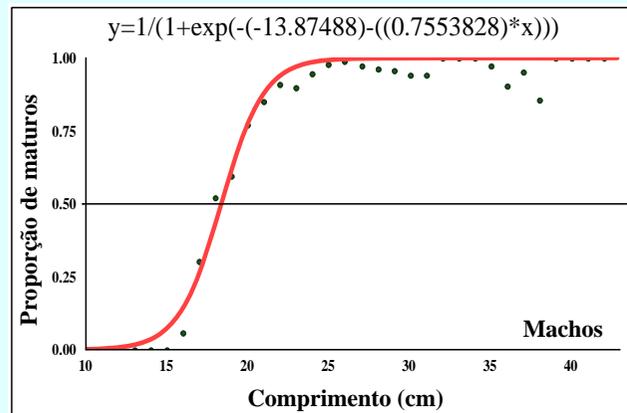
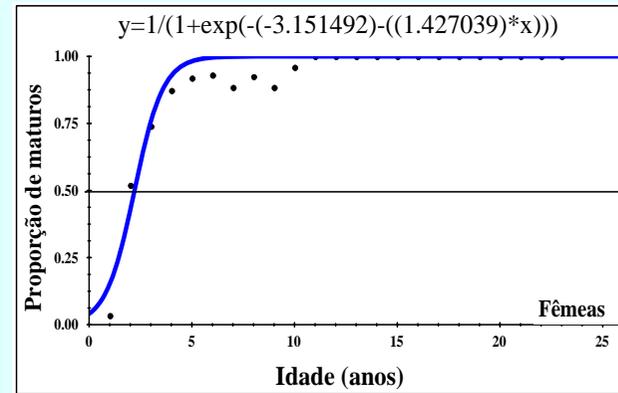
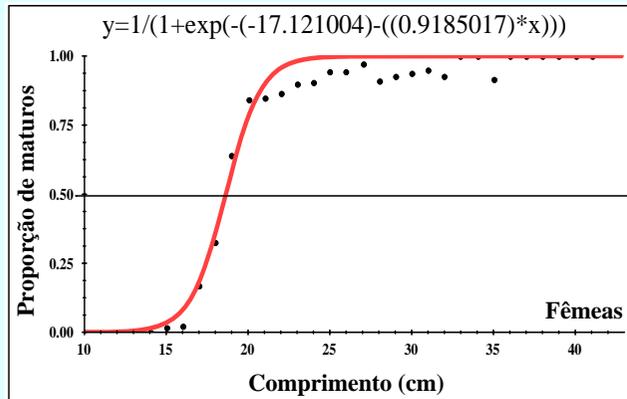
- Poucos oócitos vitelados
- Folículos presentes em número variável
- Pode ocorrer atresia

## 6. Início da recuperação



- Muitos oócitos em atresia
- Alguns oócitos em início de vitelogénese

# Ogivas de maturação



Comprimentos

Idades

Classe de comprimento = **18 cm**

Classe de idade = **2 anos**

# Fracção de desova

% de fêmeas a desovar por dia, com base na presença de:

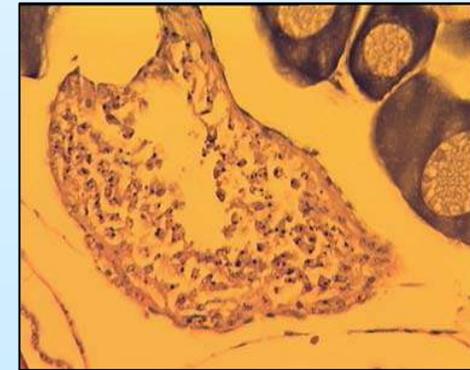
Núcleos  
migrados



Oócitos  
hidratados

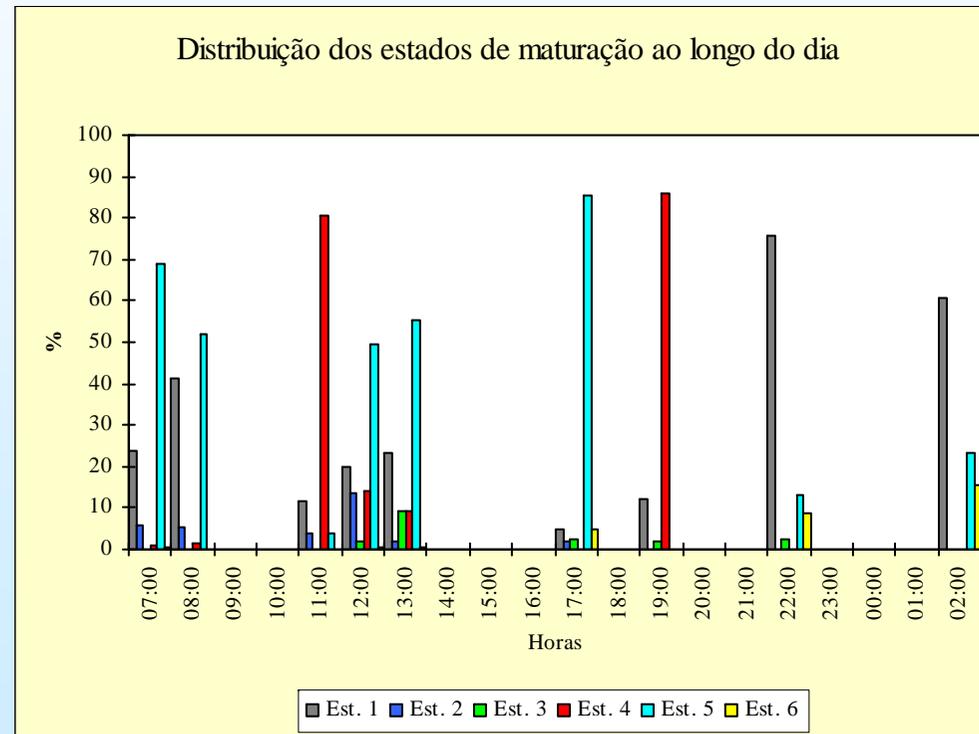


FPOs



# Hora de postura

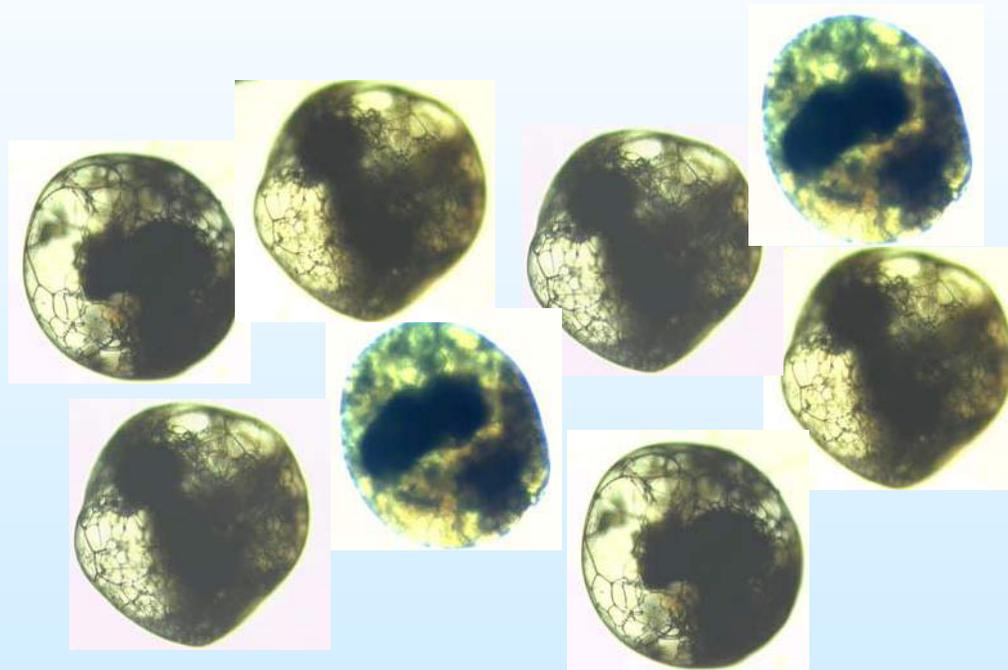
Com base na distribuição dos vários estados de maturação ao longo do dia



Conclusão: O carapau não parece ter uma hora de postura definida

# Fecundidade parcial

Com base na contagem de oócitos hidratados:



Nas gónadas cujos cortes histológicos não apresentem folículos

## **ANEXO 2 – III**

“Horse Mackerel maturity stages review (1992-2002) in the ICES Division IXa (Portugal and Gulf of Cadiz)” – Costa, A. M., Pissarra, J. and Murta, A., 2003



COMISSÃO EUROPEIA

Fundos Estruturais



Percentagem de erro na identificação  
macroscópica dos estados de maturação  
do carapau (*Trachurus trachurus*)

Trabalho realizado no âmbito do projecto  
“Triennial Egg Surveys”

com amostras recolhidas no âmbito do projecto

PNAB/EU – Recolha de Dados

**HORSE MACKEREL MATURITY STAGES  
REVIEW (1992-2002) IN THE ICES DIVISION  
IXa (PORTUGAL AND GULF OF CADIZ)**

Costa, A. M.; Pissarra, J.; Murta, A.

WGMEGS – Lisbon, 29 March to 4 April 2003

⇒ Macroscopic ≠ microscopic id.

⇒ Mic. mat. st. dist. pat.

Spawning season

Non-spawning season

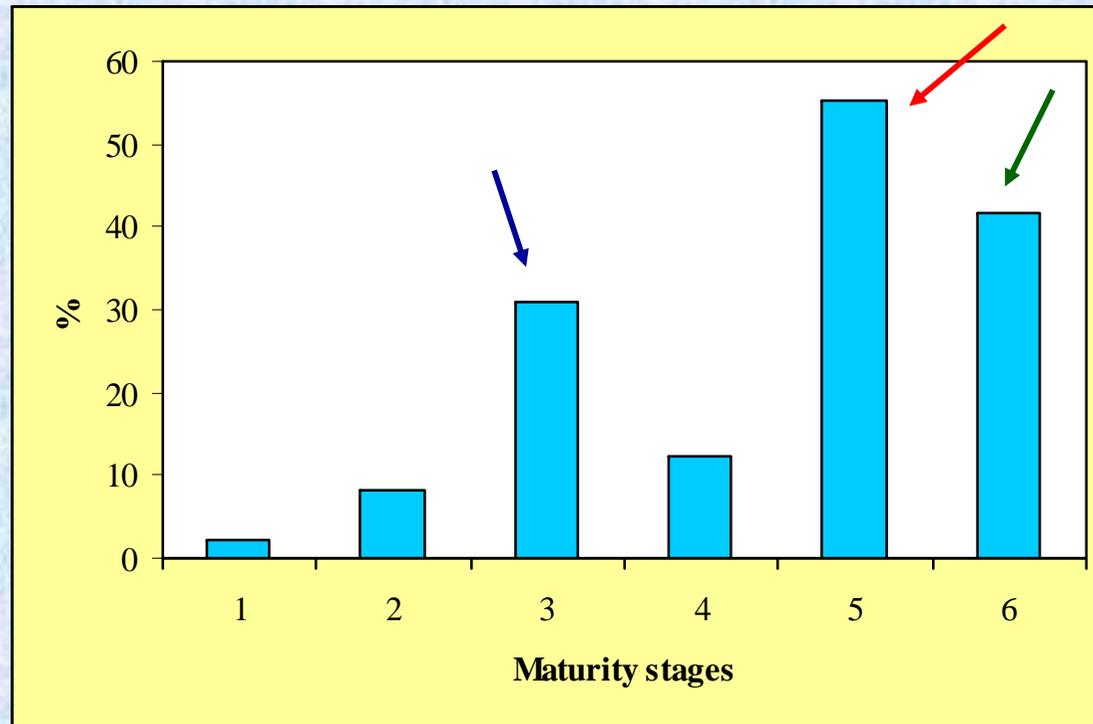
⇒ Oocytes diameter distrib.

→ Indeterminate ?

⇒ Mat. st. dist. in spawning season

1992-95

1998-02

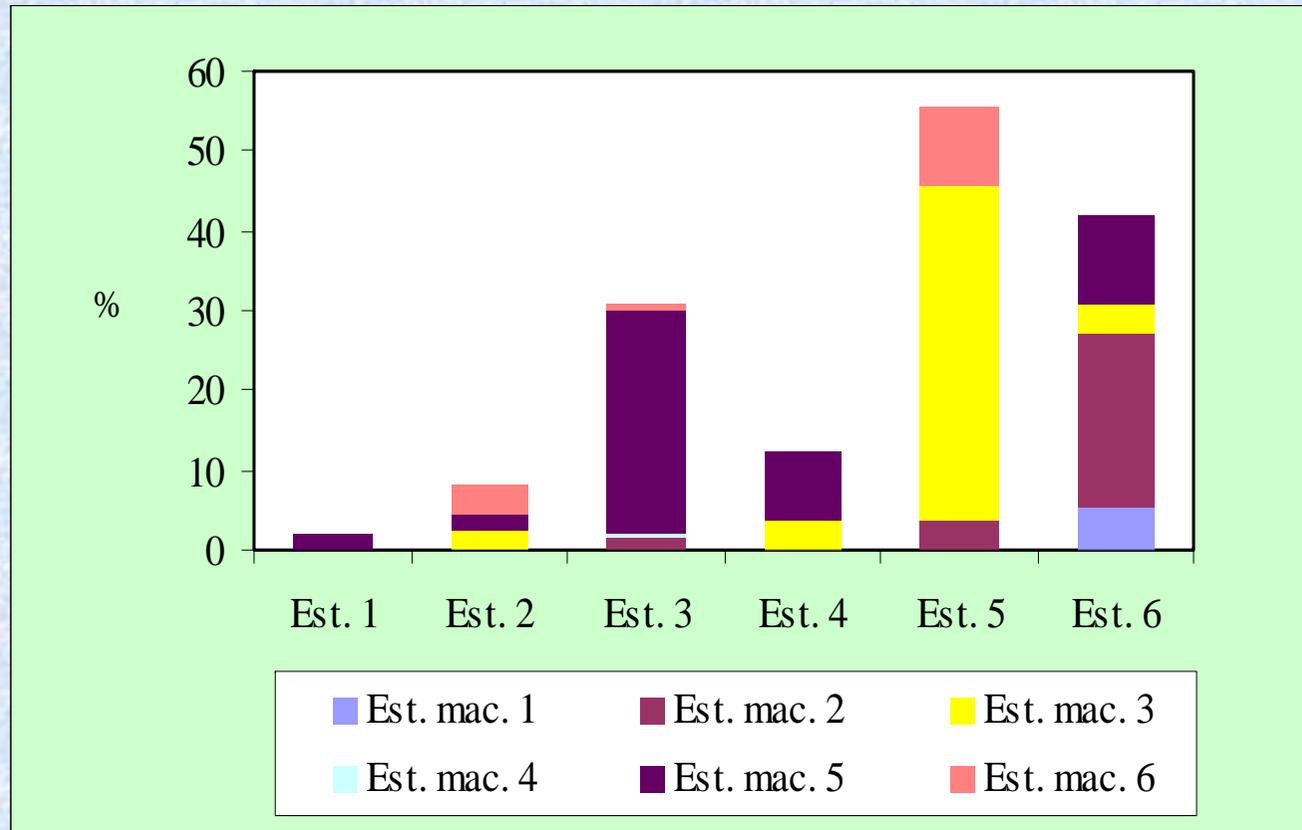


% errors in macroscopic identification

stage 5 > 55%

stage 6 – 42%

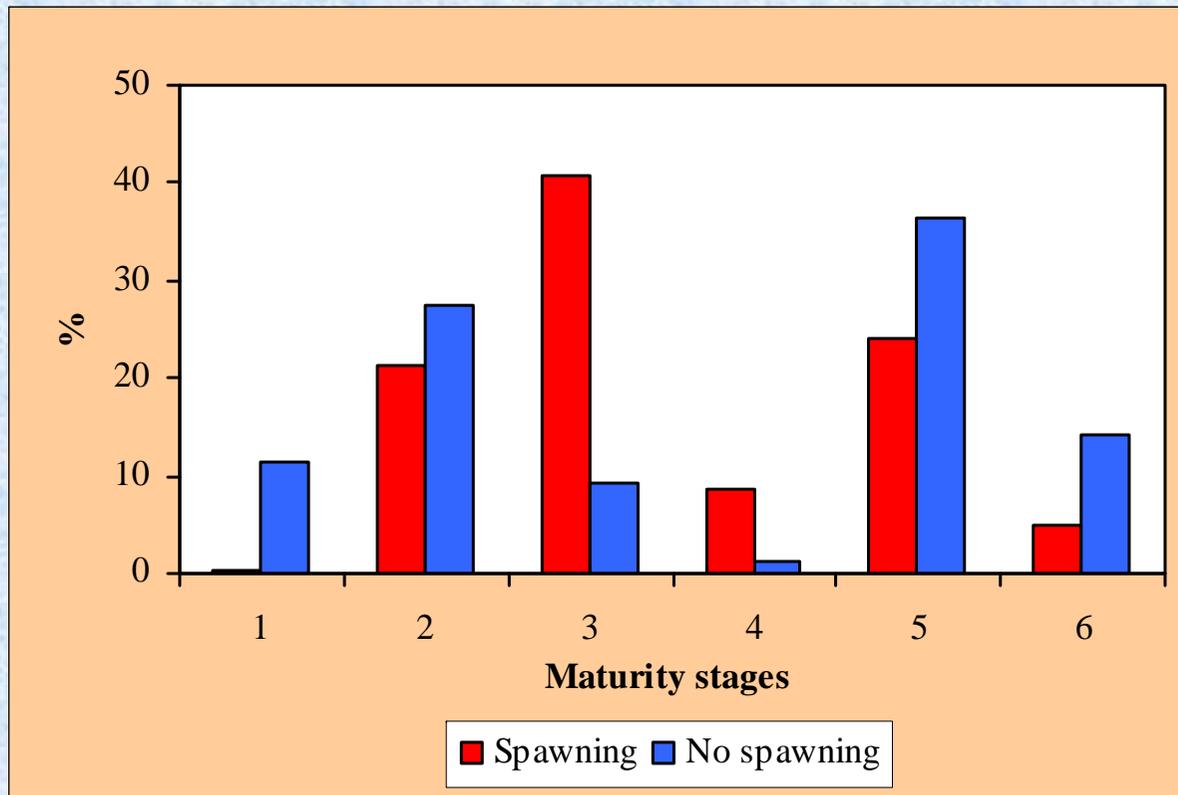
stage 3 – 31%



Macroscopic error distribution (%)

42% mac. st. 5 are st. 3

28% mac. st. 3 are st. 5

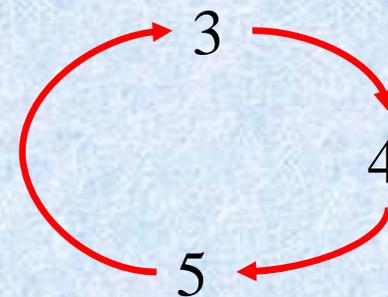


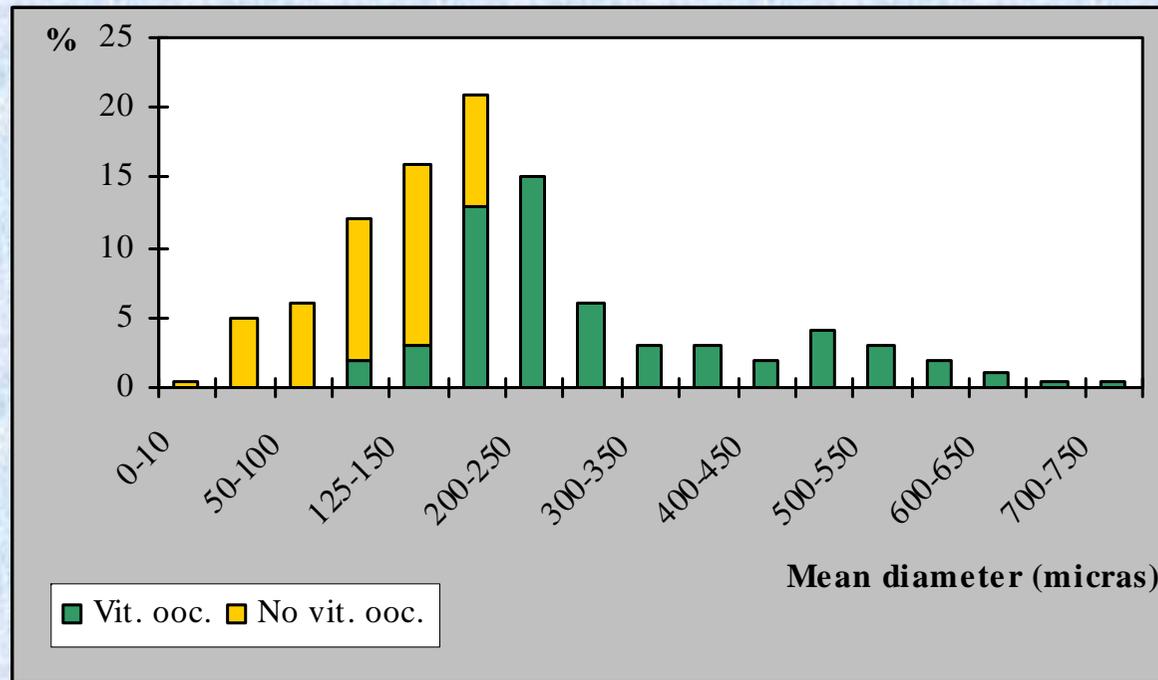
S.S. – stage 3

N.S.S. – stage 5

Microscopic maturity stages distribution

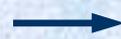
BATCH CYCLE



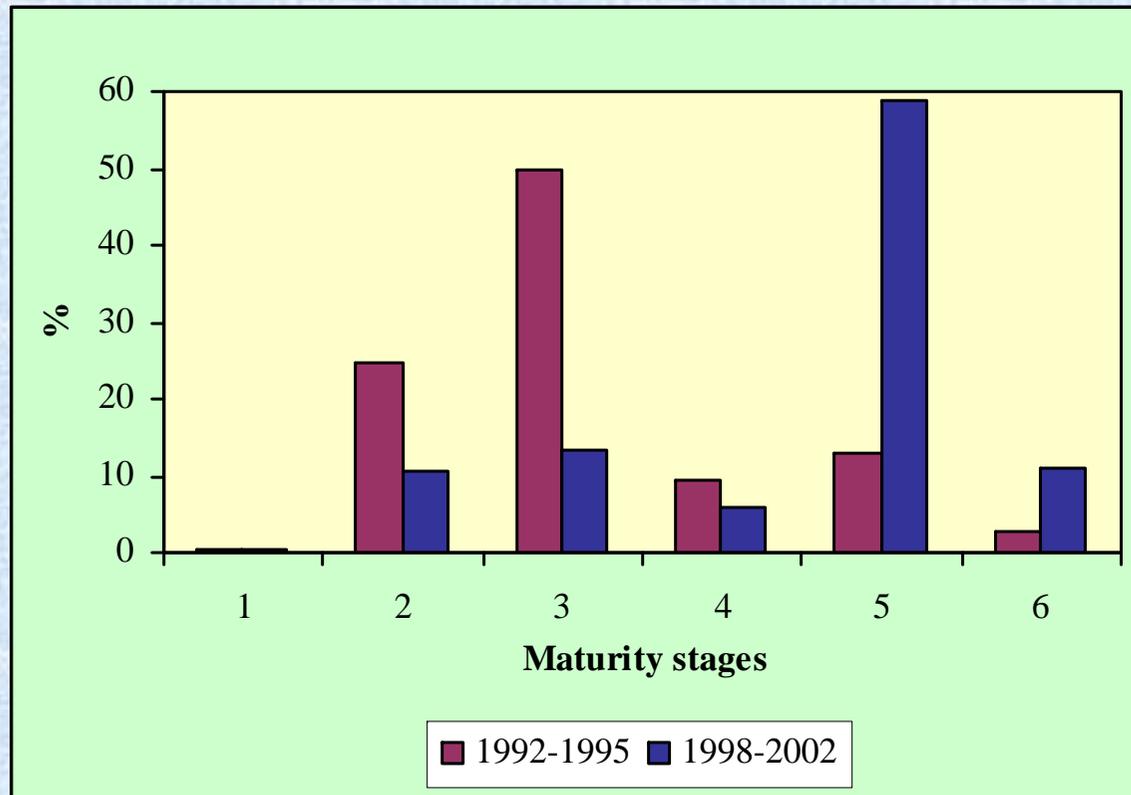


Distribution of oocytes diameter

Continuous distribution



Indeterminate spawner (?)



Maturity stages during the spawning season

Stage 3 in 92-95  $\Rightarrow$  stage 5 in 98-02

## CONCLUSIONS:

- Macroscopic identification of stages 3 and 5 can be deeply confounded.
- High proportion of stage 3 during the spawning season was observed.
- There is no microscopic difference between pre-spawning stage 3 and subsequent stages 3.
- Continuous distribution of oocytes diameter suggests that horse mackerel is an indeterminate spawner.
- Data from recent years suggests a significative displacement in the horse mackerel spawning season.

## ANEXO 2 – IV

“Horse-mackerel (*Trachurus trachurus*, L. 1758) have a Determinate or Indeterminate fecundity?” – Costa, A. M., Cunha, M. E. and Gonçalves, P., 2003

*Workshop de Histologia (22-23 de Novembro de 2006)*

*Realizado no âmbito do projecto NeoMav (QCA 3 – MARE/FEDER)*

# **Horse mackerel**

*(Trachurus trachurus Linnaeus,  
1758)*

**have a Determinate or  
Indeterminate Fecundity?**

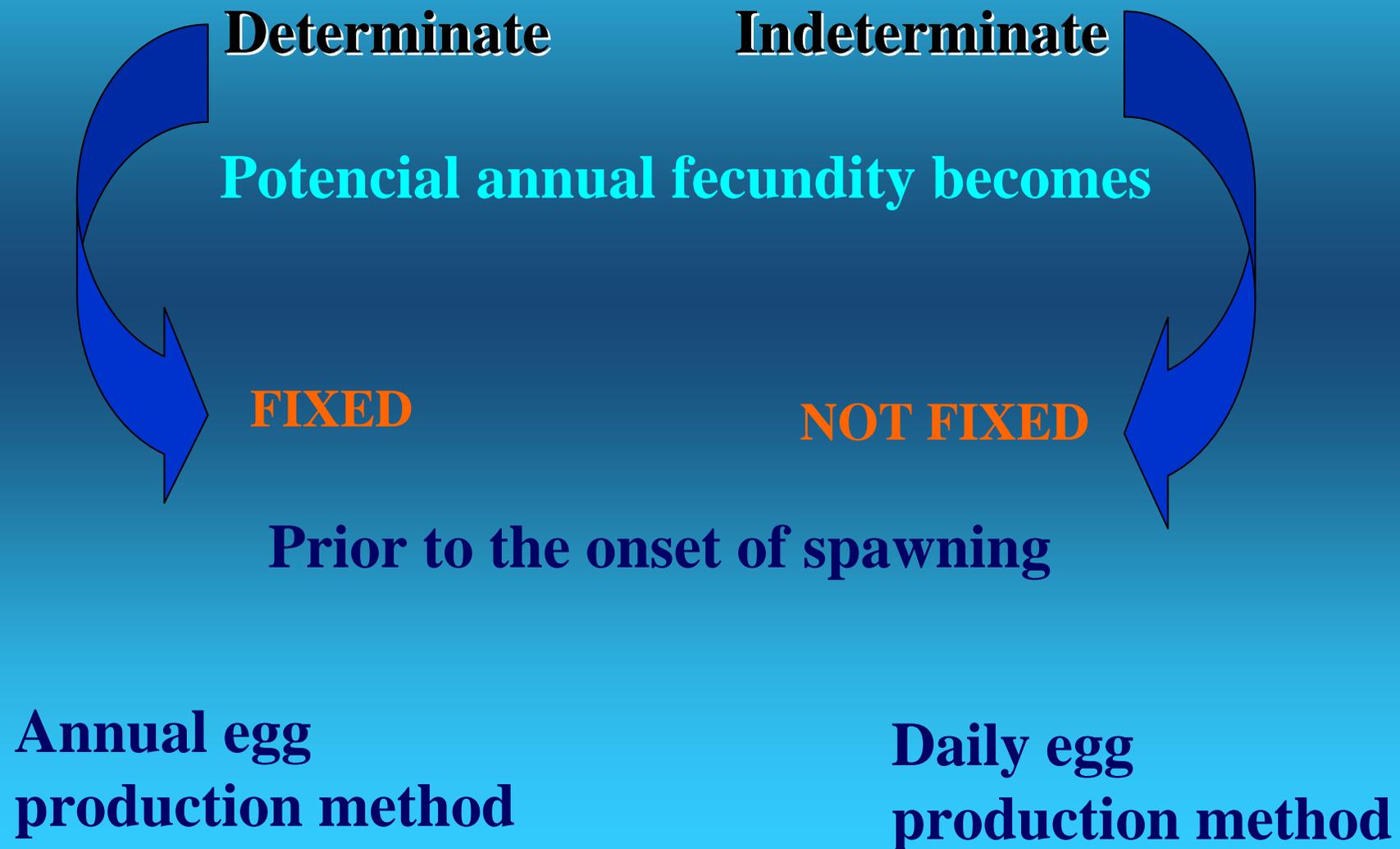


**IPIMAR**

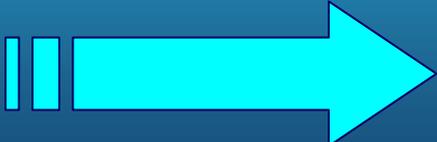
**Realized  
by:**

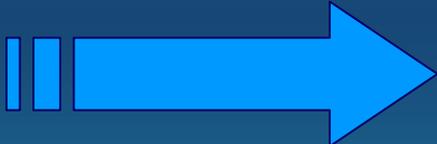
**Patrícia Gonçalves, Ana Costa,  
Maria Emília Cunha**

## Two different approaches of reproductive strategy:



# Total fecundity

**Determinate**  **Decreases**

**Indeterminate**  **Not decreases**

Such fishes usually spawn  
many times during the season

with each spawning season

The standing stock of advanced\* **yolked oocytes** at the start of the season give:

- **indication** of fecundity, because that stock is **not replaced** during the spawning season

**(Determinate)**

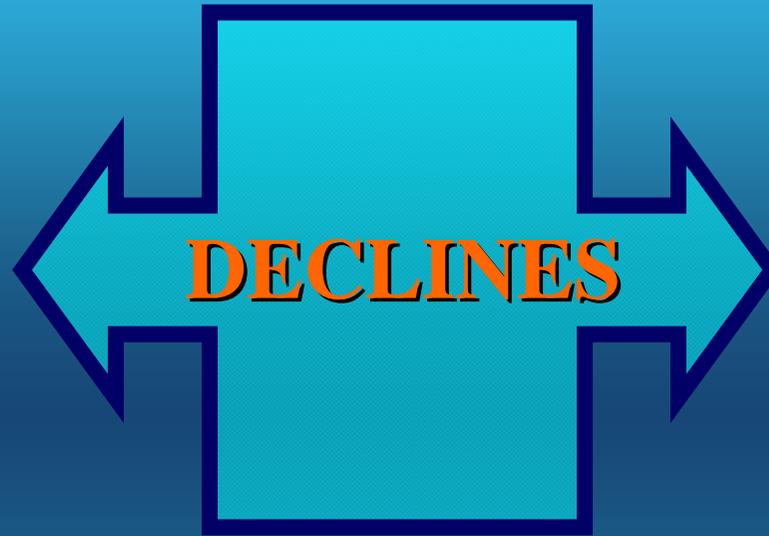
- **no indication** of the fecundity, because unyolked oocytes **continue to be mature** and spawned during the spawning season

**(Indeterminate)**

\* (Hunter *et al*, 1989)

The total number of vitellogenic oocytes

**Determinate**



Large number of fish in the spawning category would have to be close to the end of the spawning

**Indeterminate**

**Not declines**

**Determinate**

**Indeterminate**

## **Atresia**

( vitellogenic oocytes)

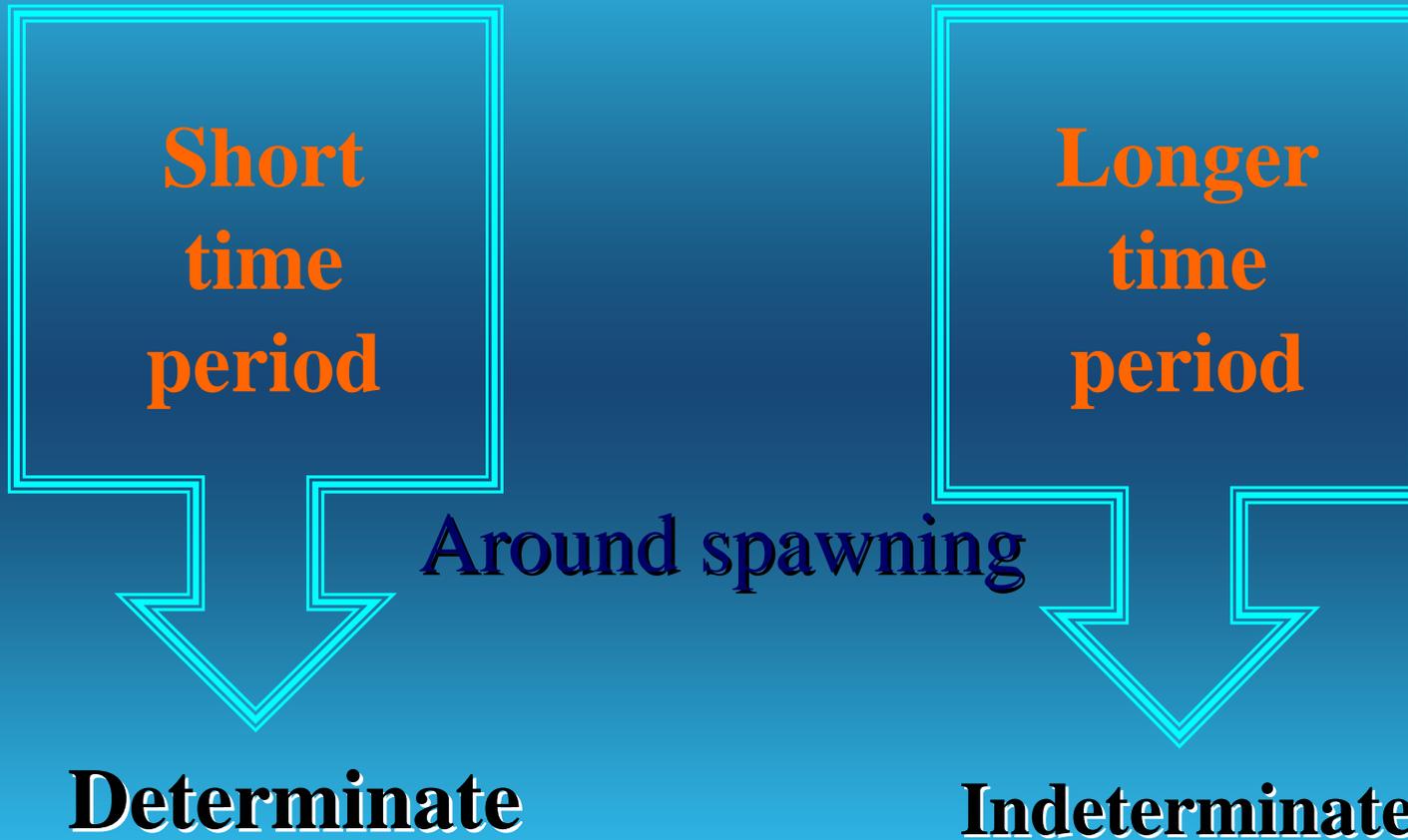
**Low**

- atretic losses balanced any production of new vitellogenic oocytes

**High**

- large scale atresia at the end of the spawning season

The production of previtellogenic oocytes  
occurs



# The mean diameter of vitellogenic oocytes

**Increases**

**Determinate**

**Remains constant**

- As the production of new vitellogenic oocytes declined until spawning

- oocytes becomes atretic during spawning
- vitellogenic oocytes reach the migratory nucleus stage at a smaller size towards the end

**Not Increases**

**Indeterminate**

**The aim of this work:**

Is study the reproductive strategy  
of horse mackerel, by

**Comparing the variation of the total number  
of oocytes during the spawning period at  
three different periods (beginning, middle  
and ending)**

## **Material and Methods:**

- Fish samples collected during the spawning season (beginning, middle and ending)
- **From each fish:**

**Total length**

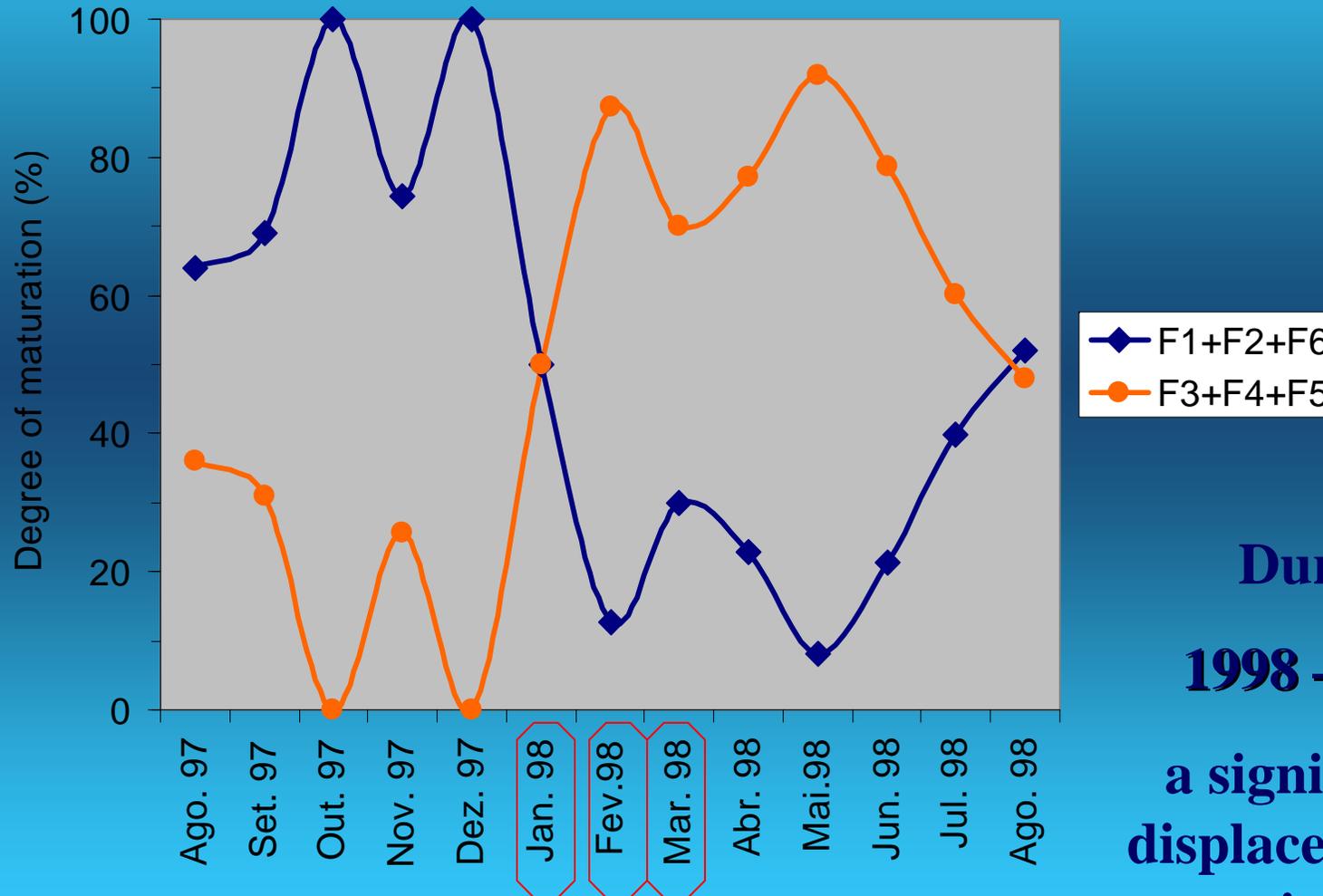
**Total weigh**

**Ovaries weigh:** **Histological techniques**

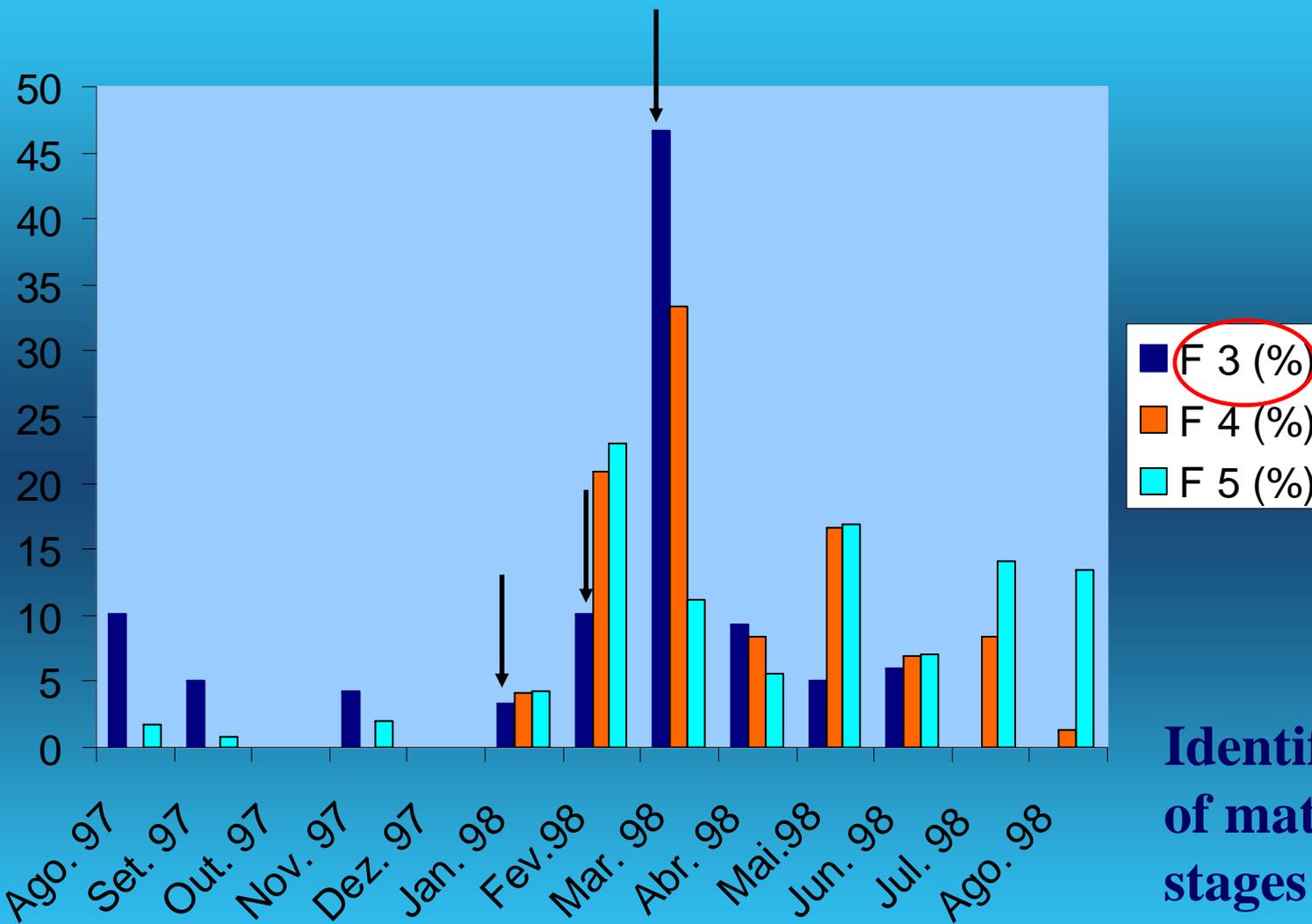
**Identification of maturity stages:**

**Macroscopic and Microscopic**

# Spawning season – 1998



**During  
1998 – 2002  
a significant  
displacement on  
spawning season**



PNAB database

**Identification of maturity stages based on macroscopic identification**

## Determination the number of oocytes\*:

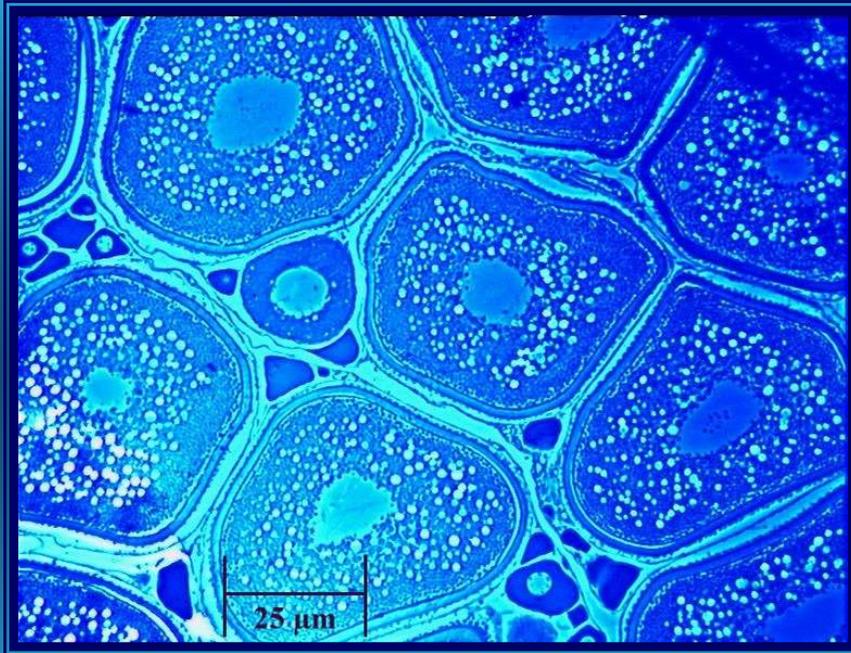


Photo:A. Costa

- histometric method

\* In all development stages  
(including nonvitellogenic oocytes)

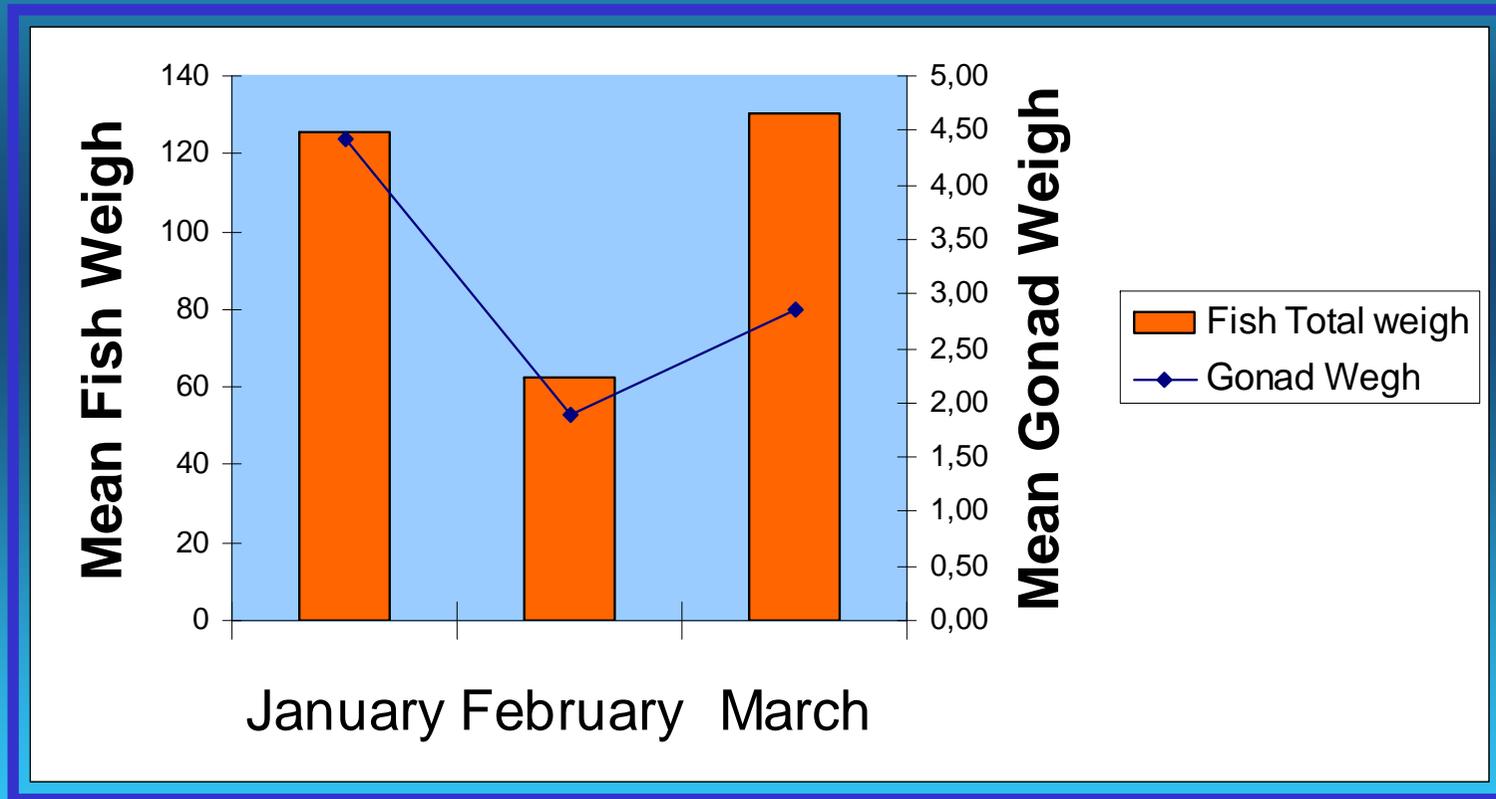
# Determination the mean diameter of oocytes:



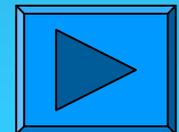
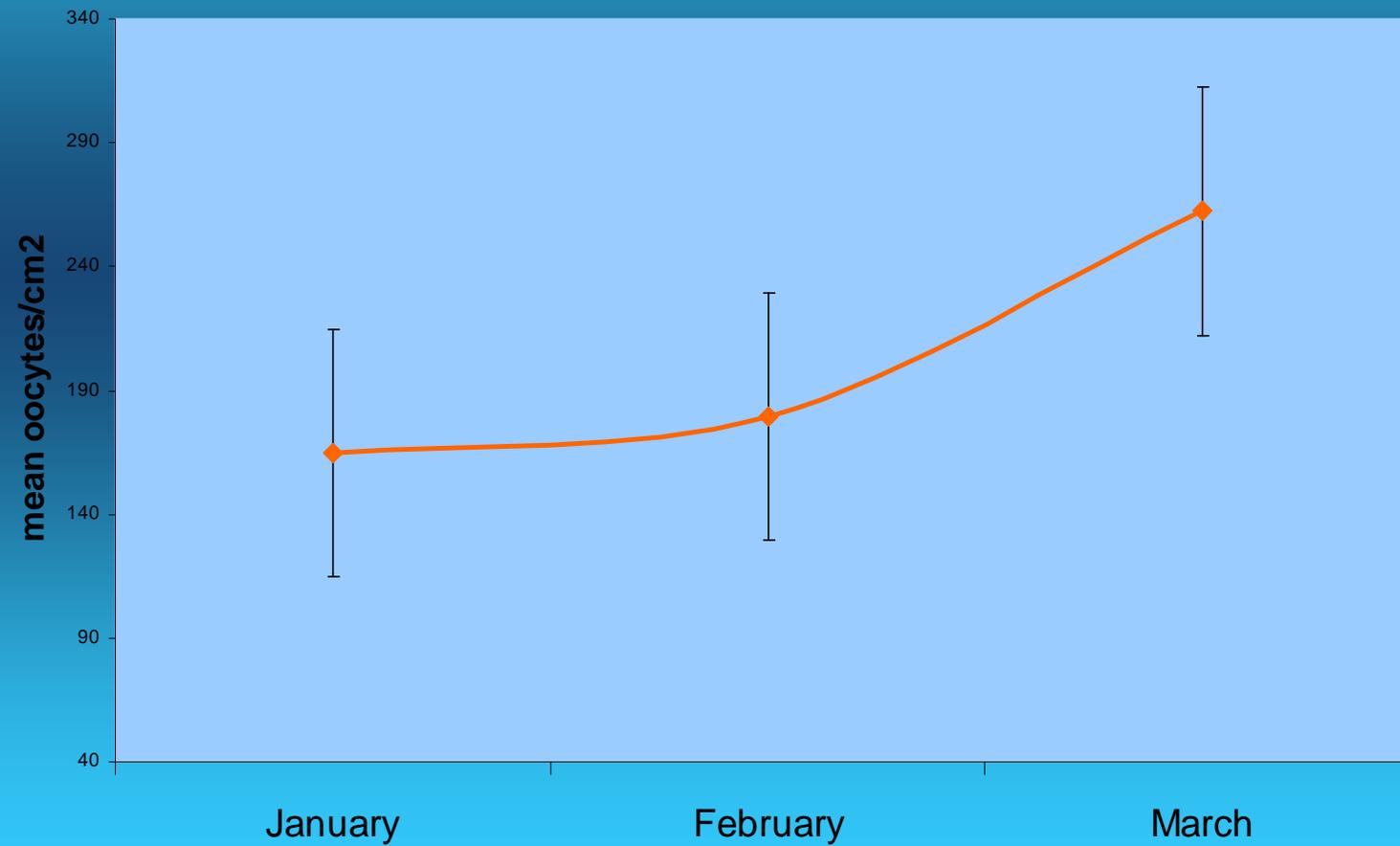
Photo:A. Costa

- calculating oocytes radius

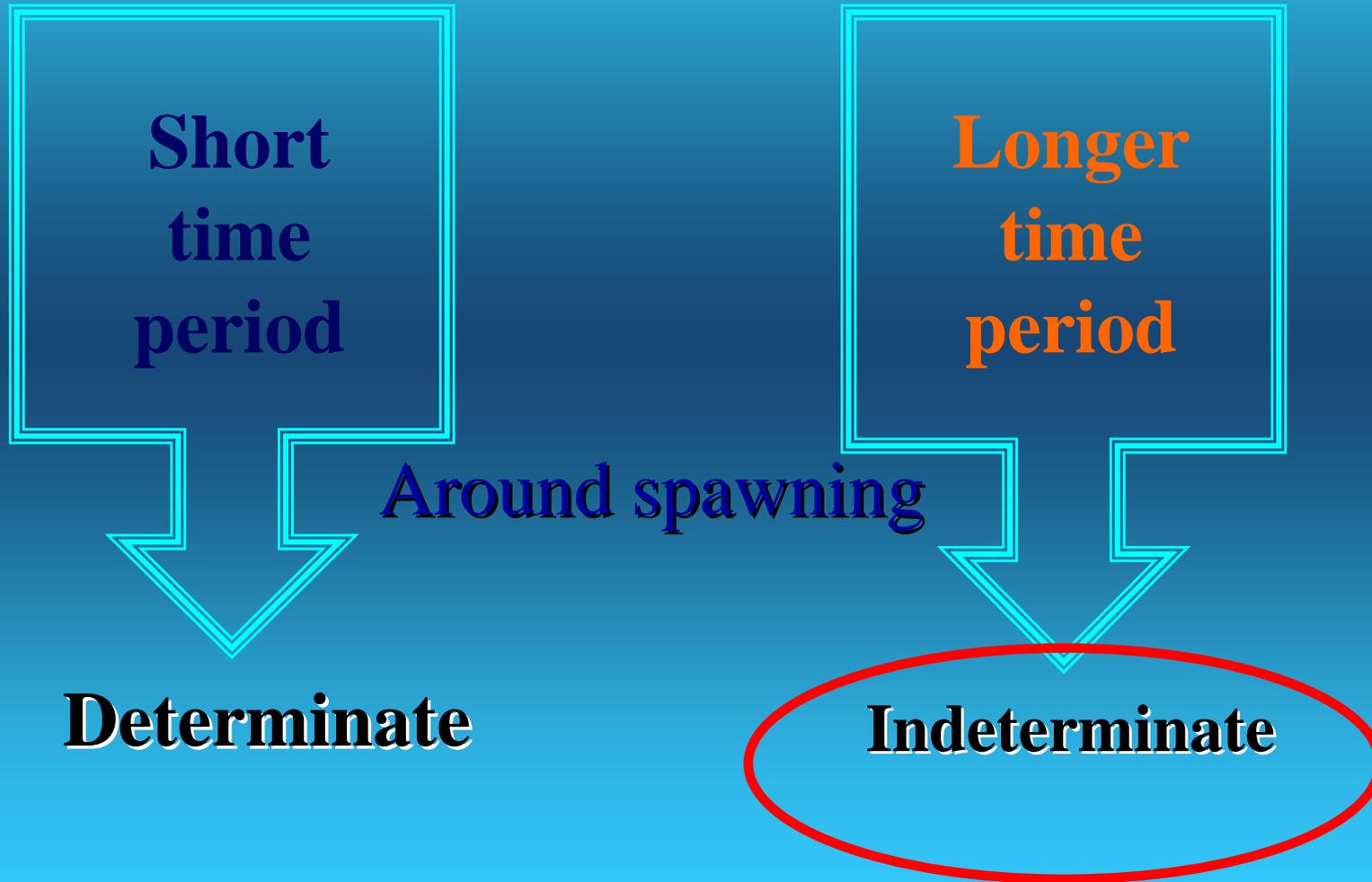
# Results:



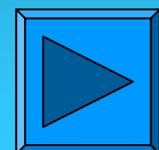
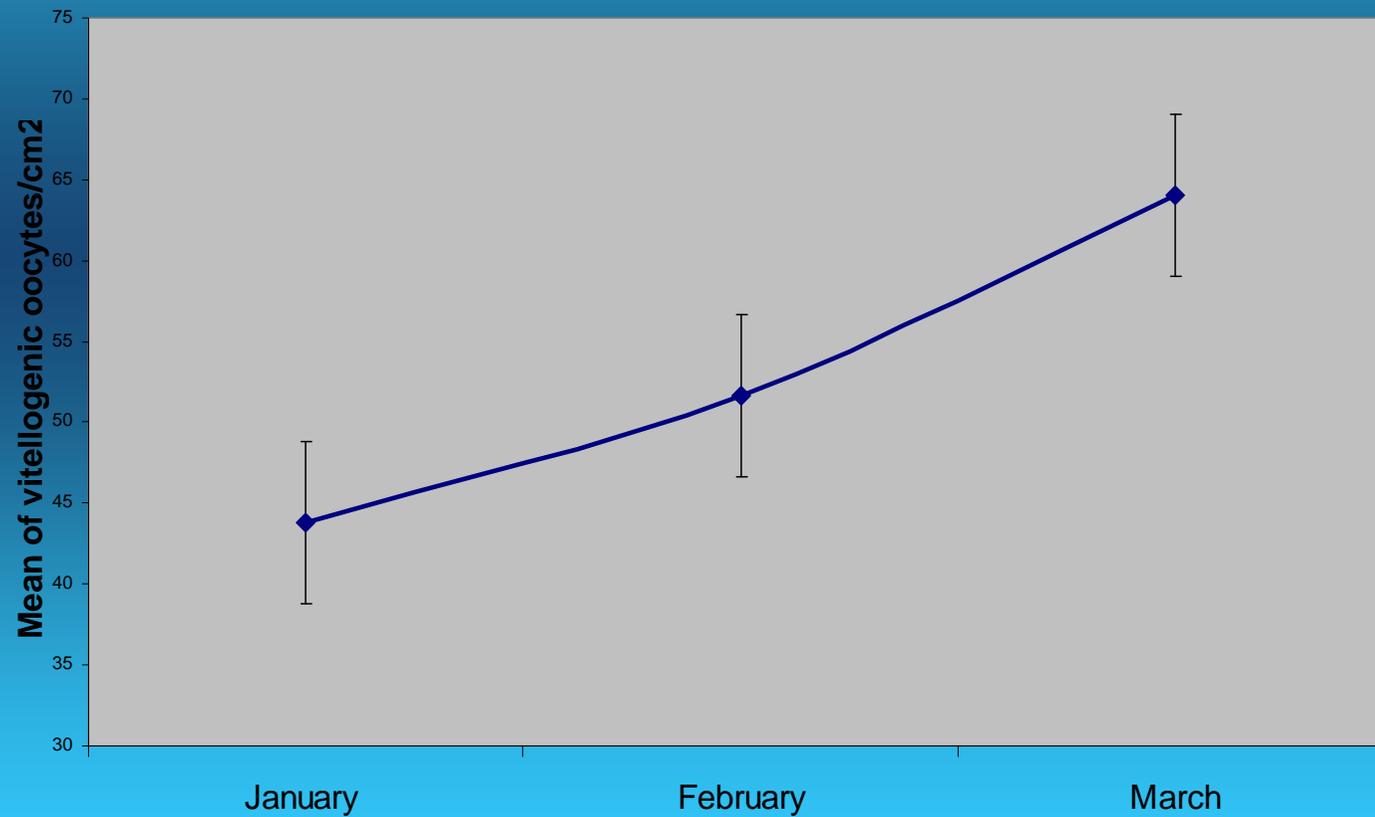
# The mean number of oocytes by cm<sup>2</sup>



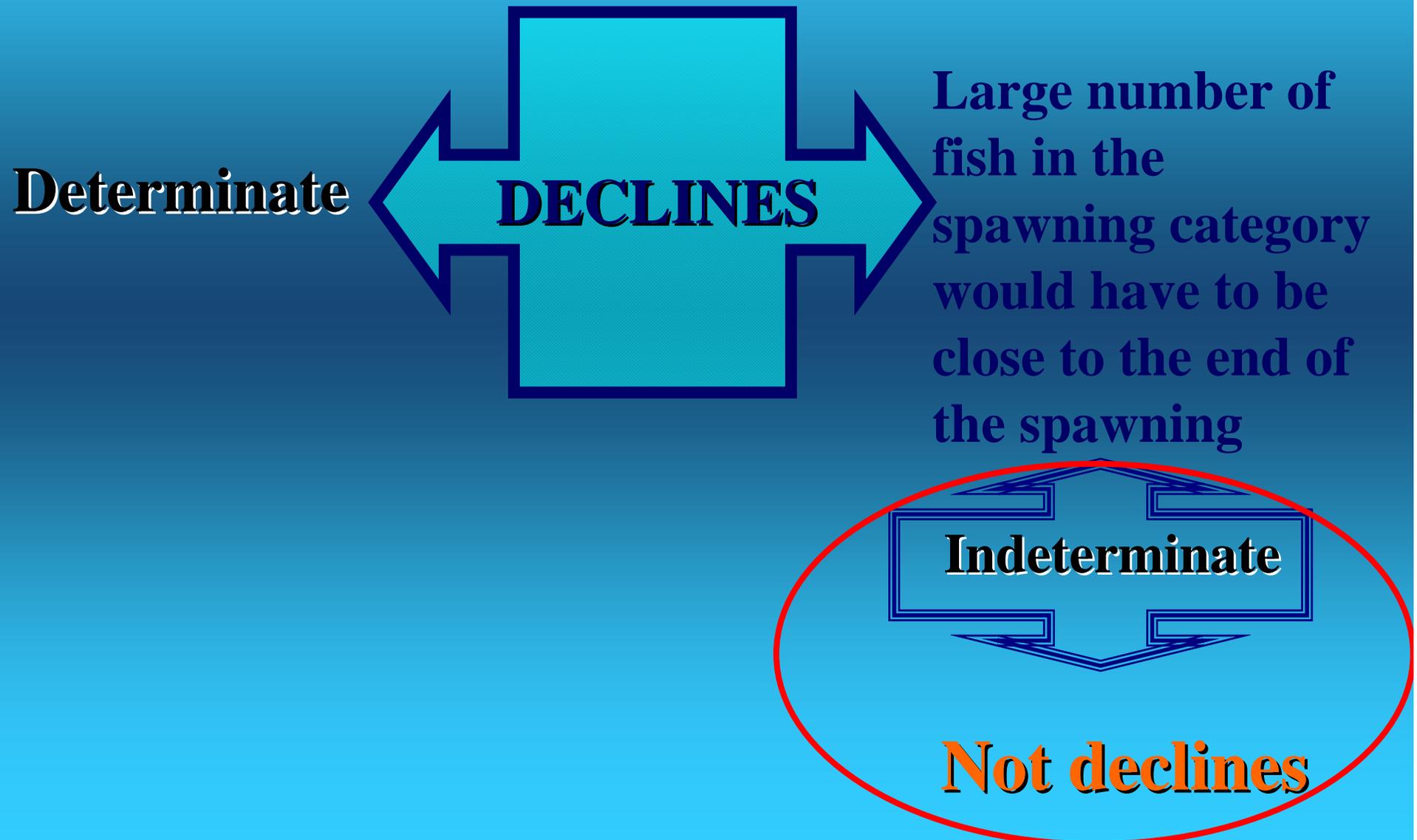
The production of previtellogenic oocytes occurs



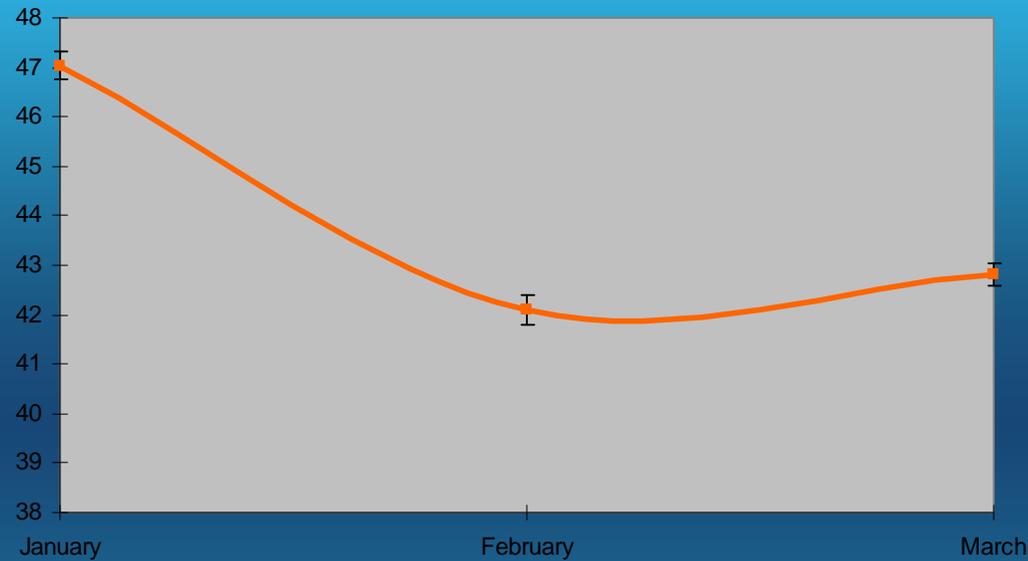
# The mean number of vitellogenic oocytes by cm<sup>2</sup>



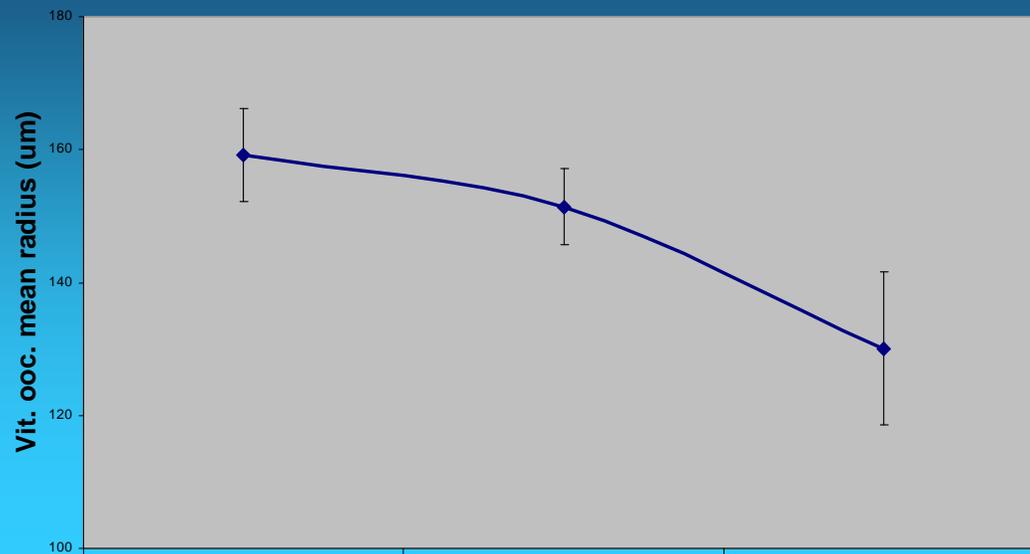
# The total number of vitellogenic oocytes



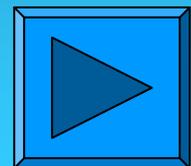
# The mean diameter of oocytes:



**Previtellogenic  
oocytes**



**Vitellogenic  
oocytes**



# The mean diameter of vitellogenic oocytes

**Increases**

**Determinate**

**Remains constant**

- As the production of new vitellogenic oocytes declined until spawning

- oocytes becomes atretic during spawning
- vitellogenic oocytes reach the migratory nucleus stage at a smaller size towards the end

**Decreases**

**Indeterminate**

**Determinate**

**Indeterminate**

## **Atresia**

( vitellogenic oocytes)

**Low**

- atretic losses balanced any production of new vitellogenic oocytes

**High**

- large scale atresia at the end of the season

# Discussion and Conclusions:

Total number of oocytes **increases** during the spawning period

What can be explain:

- **A continuous production of new oocytes.**
- **Unyolked oocytes continue to be mature and spawned**

**Indeterminate**

The mean diameter of previtellogenic oocytes **decreases**, in a generally way, during the spawning season:

What can be explain:

- **continuous production of new oocytes**
- **an increment of previtellogenic oocytes**
- **extensive large atresia**

**Indeterminate**

## **Final conclusions:**

According to our results, horse mackerel, is probably an

**Indeterminate**

**Spawner**

# **Agradecimentos:**

As amostras foram adquiridas no âmbito do projecto

**PNAB/EU – Recolha de Dados**

## **ANEXO 2 – V**

“Congelação e Refrigeração vs Histologia” – Gonçalves, P., 2006

**Congelação e refrigeração**  
**VS**  
**Histologia**



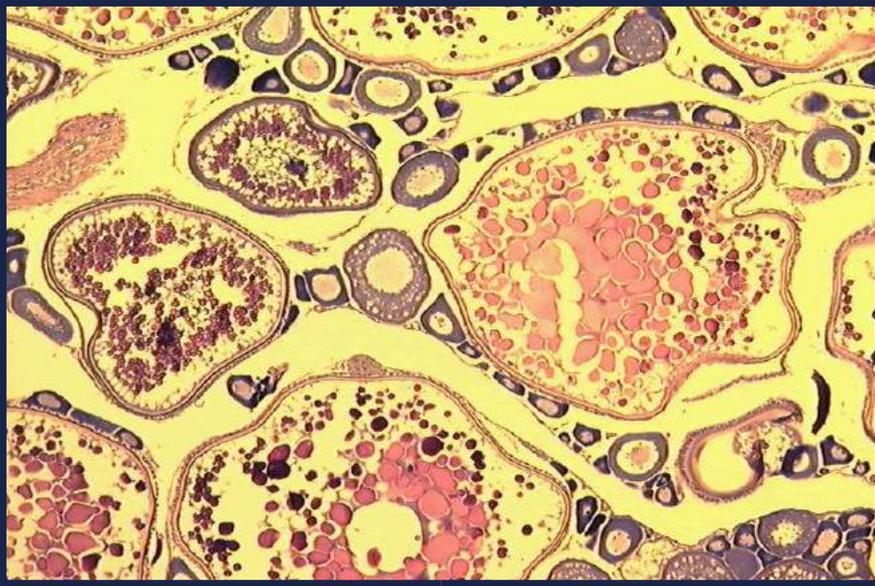
**IPIMAR**

**Patrícia Gonçalves**

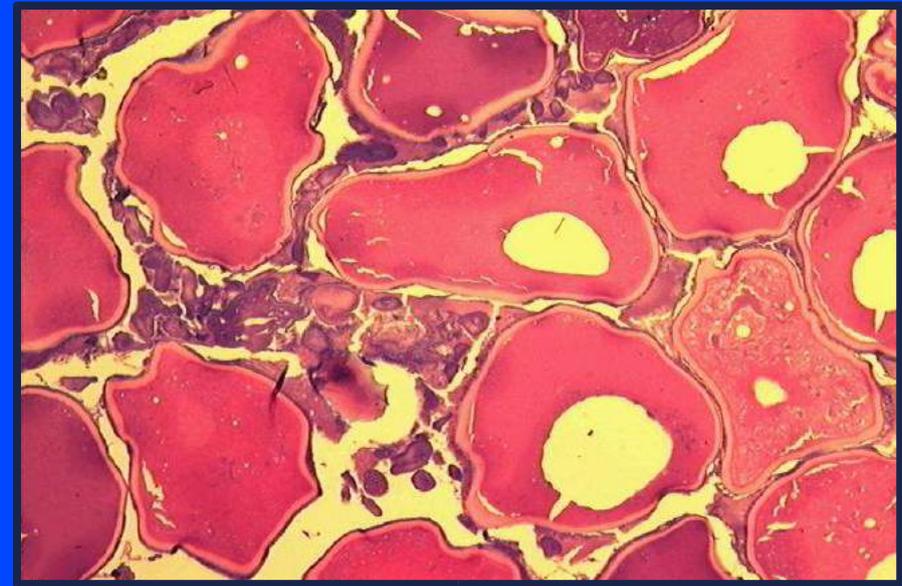
# Comparação Gónadas

Frescas vs Congeladas:

Estado III – Postura



Frescas

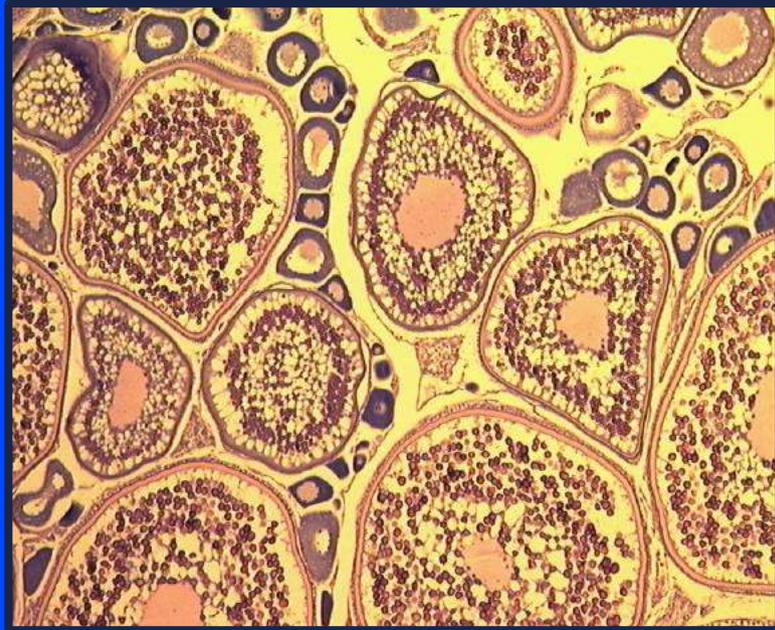


Congeladas

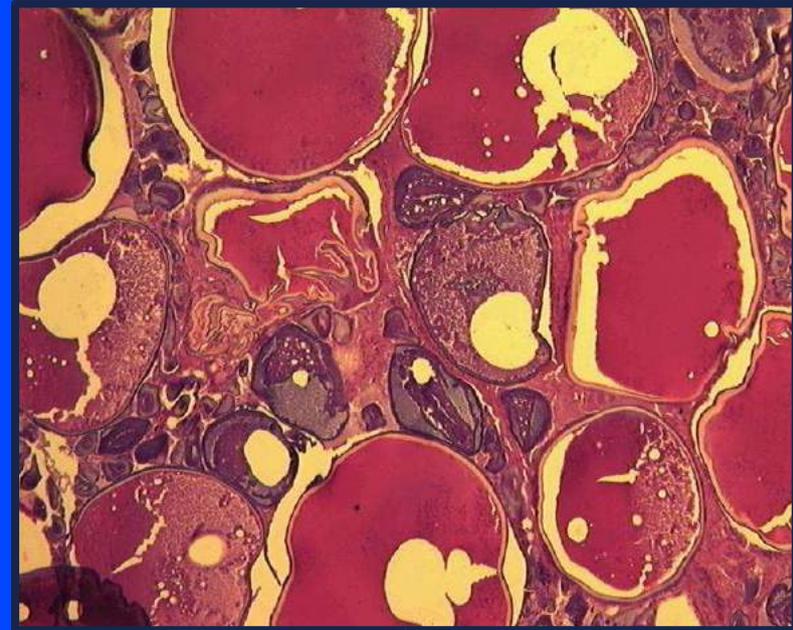
# Comparação Gónadas

Frescas vs Congeladas:

Estado V – Pós-postura



Frescas

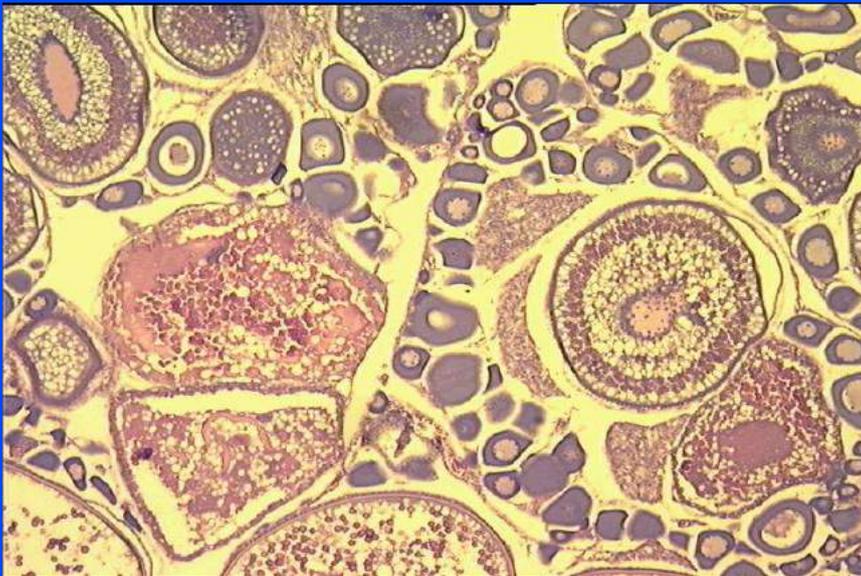


Congeladas

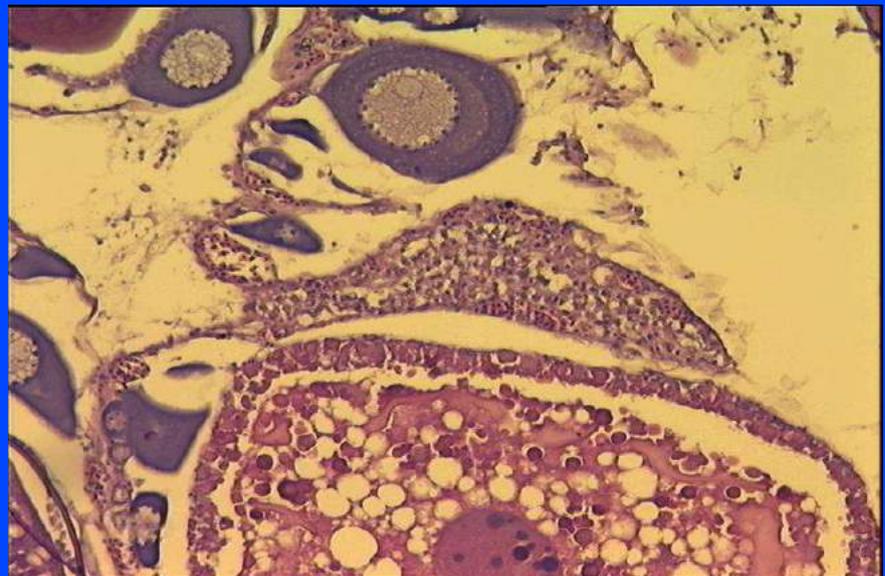
# Comparação Gónadas

**Frescas vs Refrigeradas (12, 24, 36 h):**

**Estado IV – Pós-postura**



**Frescas**

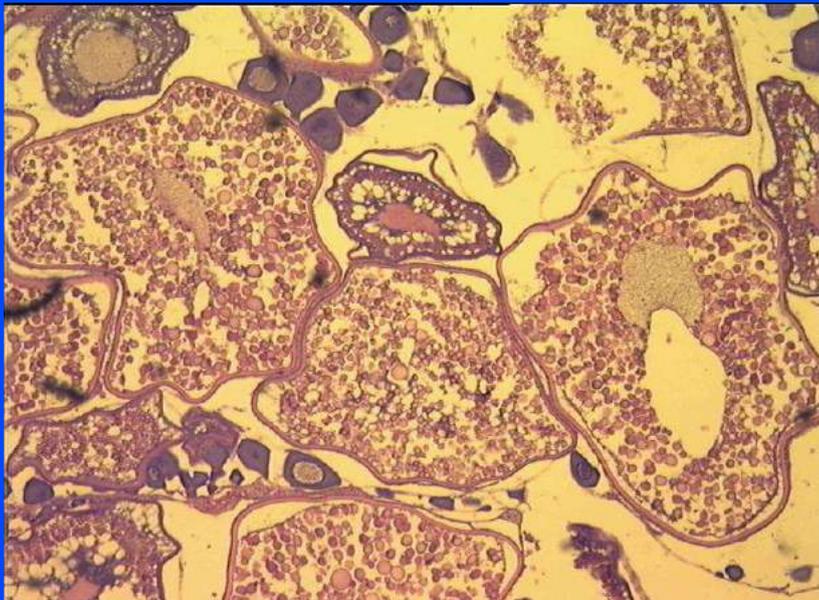


**Refrigeradas 12h**

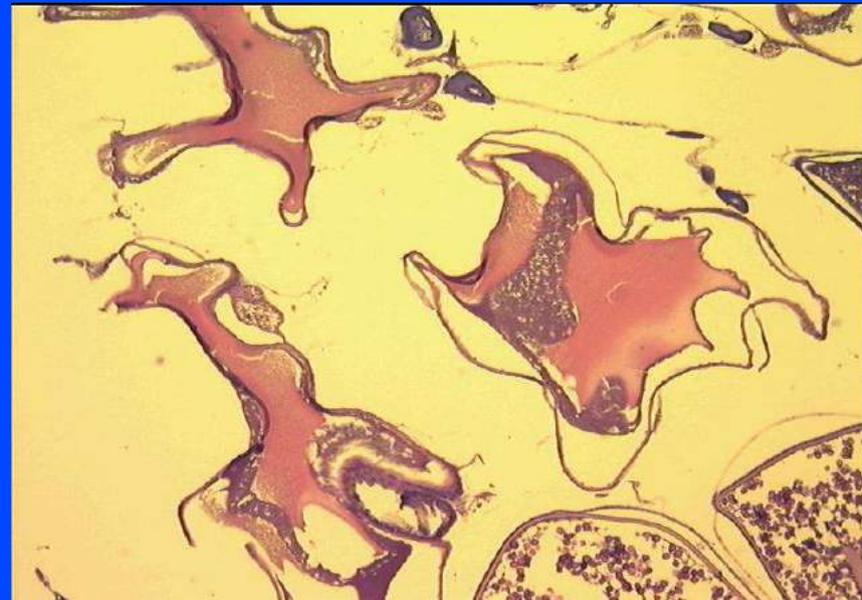
# Comparação Gónadas

**Frescas vs Refrigeradas (12, 24, 36 h):**

## Estado III – Postura



**Refrigeradas 24h**

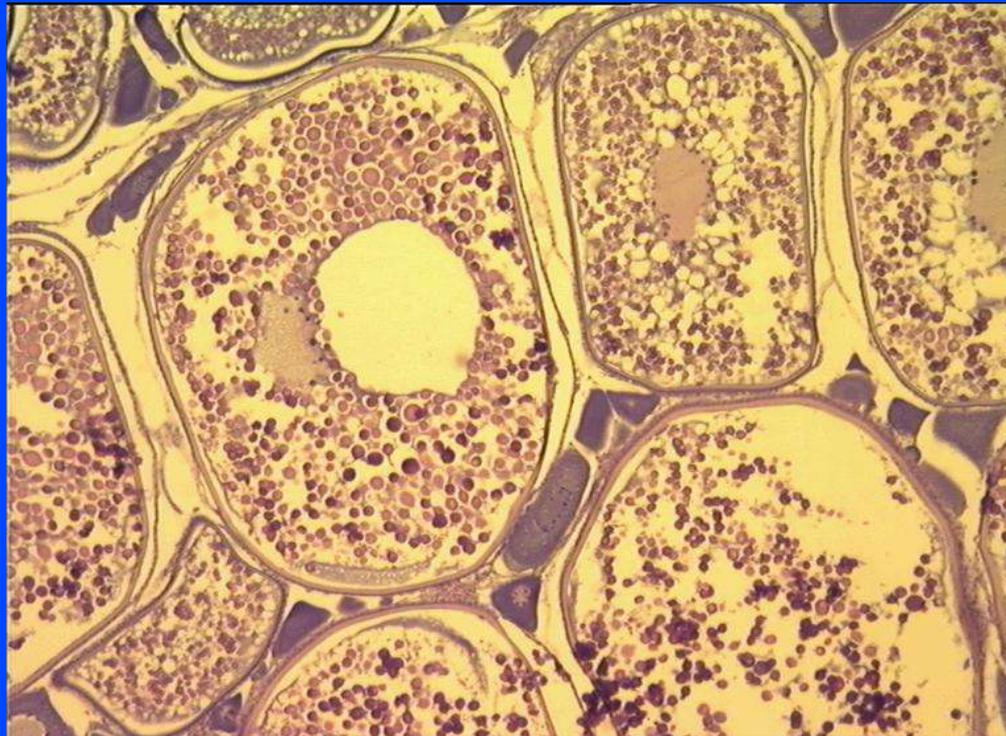


**Refrigeradas 24h**

# Comparação Gónadas

**Frescas vs Refrigeradas (12, 24, 36 h):**

## Estado III – Postura



**Refrigeradas 36h**

**Validação da identificação dos estados de maturação:**

# **Histologia**

Exemplares frescos ou refrigerados

**ANEXO 2 – VI**

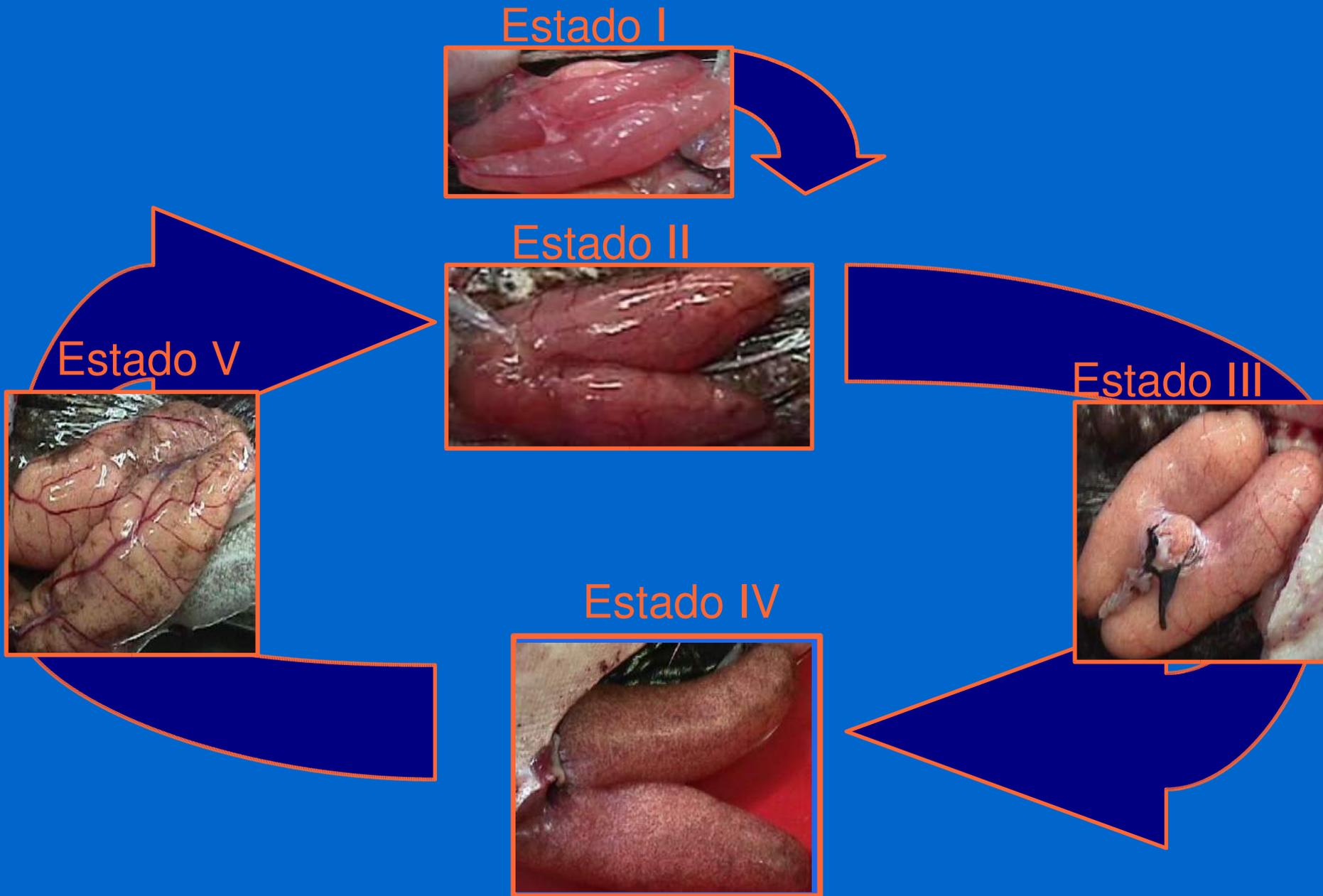
“Escala de Maturação da Pescada (*Merluccius merluccius*)” – Gonçalves, P.,  
2006

**Escala de maturação da pescada**  
*(Merluccius merluccius)*



<b>Estado de Maturação</b>	<b>Característica Macroscópica</b>
<p>I</p> <p><b>Imatura</b></p>	<p>Sem oócitos visíveis ✓</p>
<p>II</p> <p><b>Desenvolvimento</b></p>	<p>Com oócitos opacos visíveis ✓</p>
<p>III</p> <p><b>Pré-postura</b></p>	<p>Oócitos opacos e hialinos ✓</p>
<p>IV</p> <p><b>Postura</b></p>	<p>Oócitos hialinos – observando-se a sua saída junto ao hilo ✓</p>
<p>V</p> <p><b>Pós-postura</b></p>	<p>Oócitos rosados Gónada flácida ✓</p>

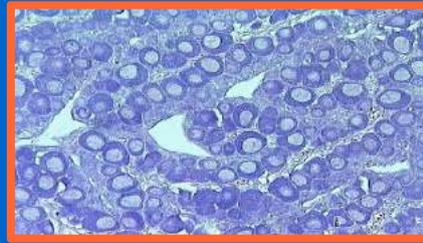
# Ciclo de maturação feminino macroscópico :



Estado de Maturação	Característica Microscópica
I Imatura	Oócitos primários ✓
II Desenvolvimento	Oócitos vitelados ✓
III Pré-postura	Oócitos em início de hidratação ✓
IV Postura	Oócitos hidratados ✓
V Pós-postura	Folículos pós-ovulatórios ✓

# Ciclo de maturação feminino microscópico:

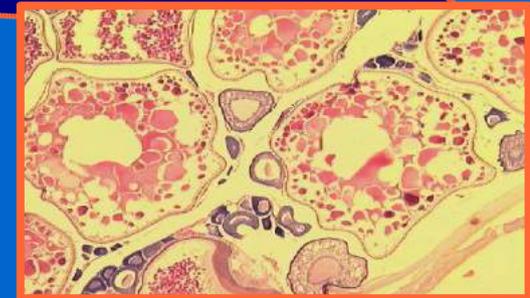
Imatura



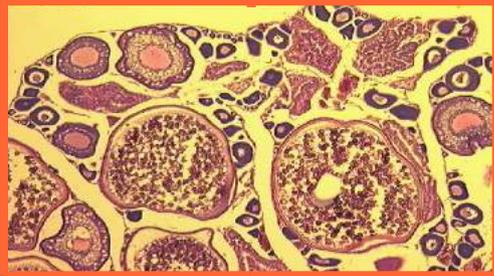
Desenvolvimento



Pré-postura



Pós-postura



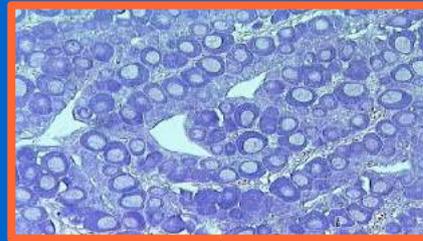
Postura



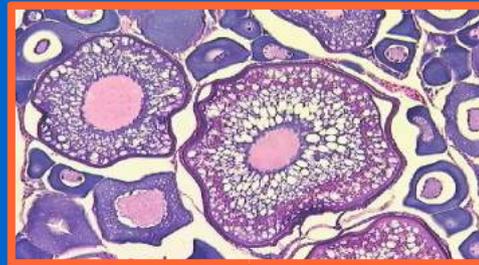
<b>Estado de Maturação</b>	<b>Característica Macroscópica</b>
<p>I</p> <p><b>Imatura</b></p>	<p>Sem oócitos visíveis ✓</p>
<p>II</p> <p><b>Desenvolvimento</b></p>	<p>Com oócitos opacos visíveis ✓</p>
<p>III</p> <p><b>Postura</b></p>	<p>Oócitos opacos e hialinos ✓</p>
<p>IV</p> <p><b>Pós-postura</b></p>	<p>Oócitos rosados Gónada flácida ✓</p>

# Ciclo de maturação feminino microscópico:

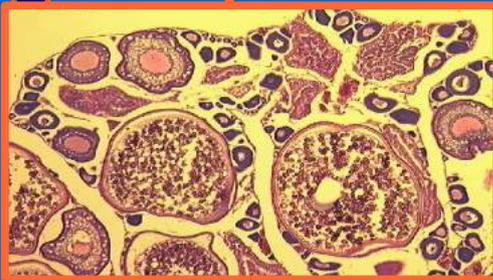
Imatura



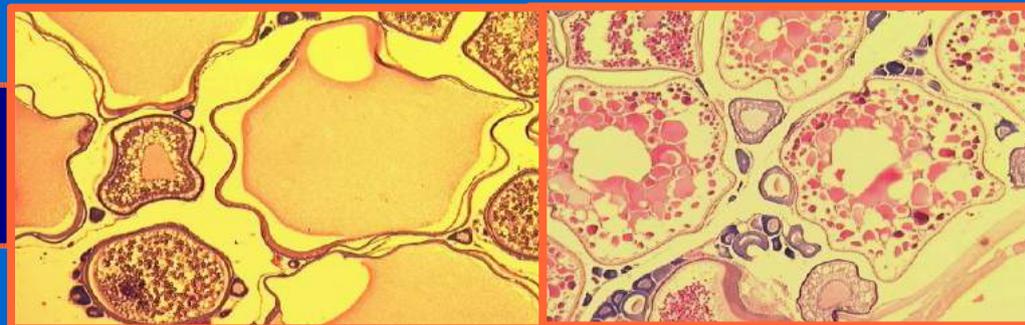
Desenvolvimento



Pós-postura



Postura



# Escala Microscópica

## Imatura

Oócitos pré-  
-vitelados (NV)



PV

## Desenvolvimento

Oócitos vitelados  
(OV)

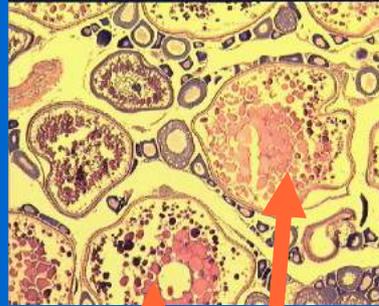


OV

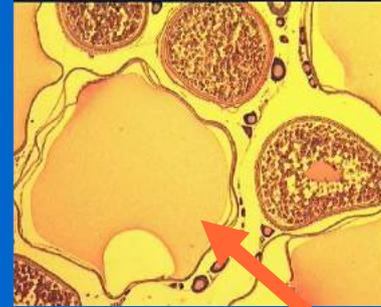
## Postura

Oócitos núcleos  
migrados (NM)

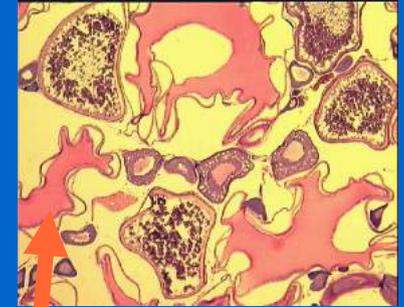
Oócitos hidratados  
(H)



NM



H



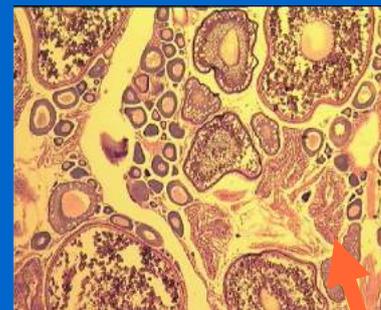
## Pós-postura

Folículos pós-  
-ovulatórios (pof's)

Oócitos atréticos  
(A)



A



Pof's



## Imatura

Oócitos pré-  
-vitelados (PN)



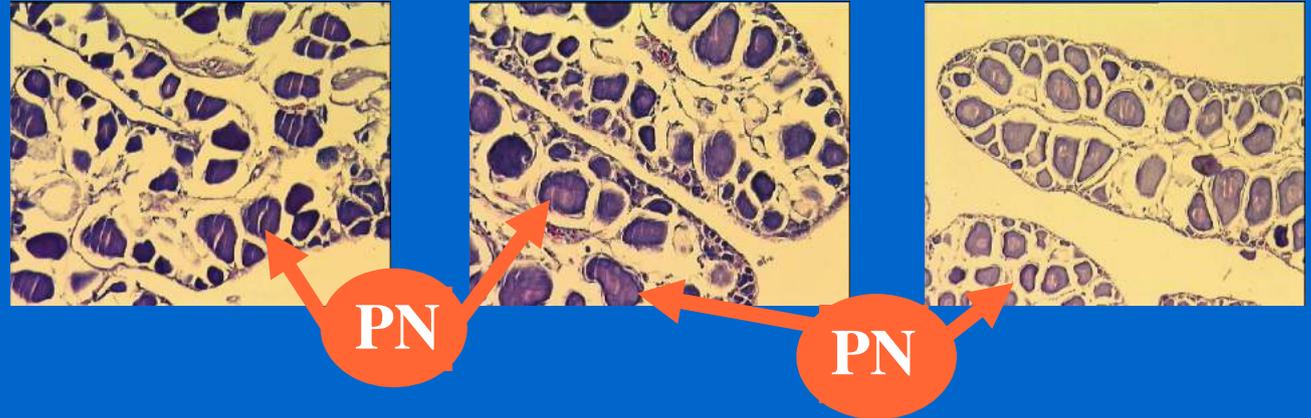
PN



PN

## Repouso

Oócitos pré-  
-vitelados (PN)

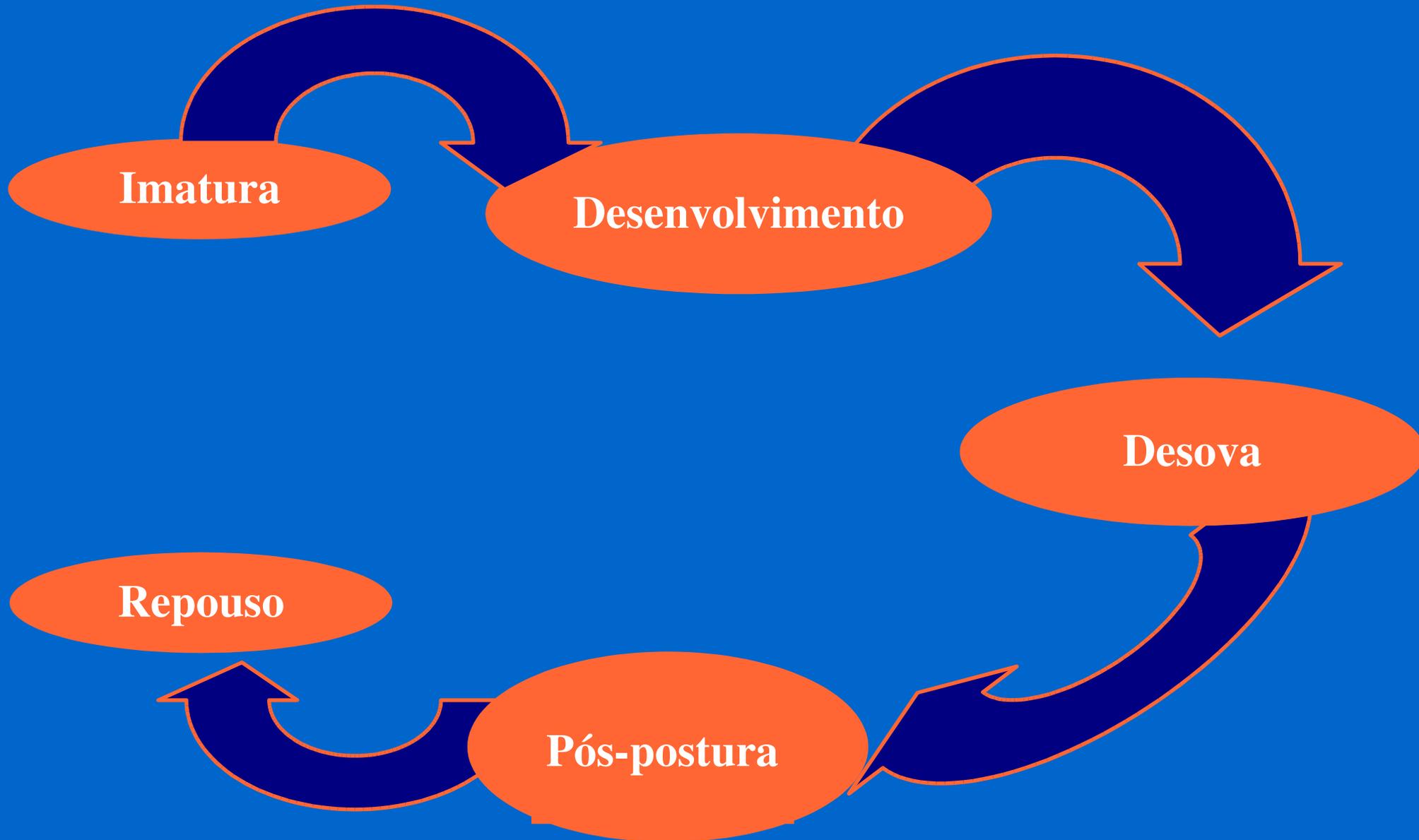




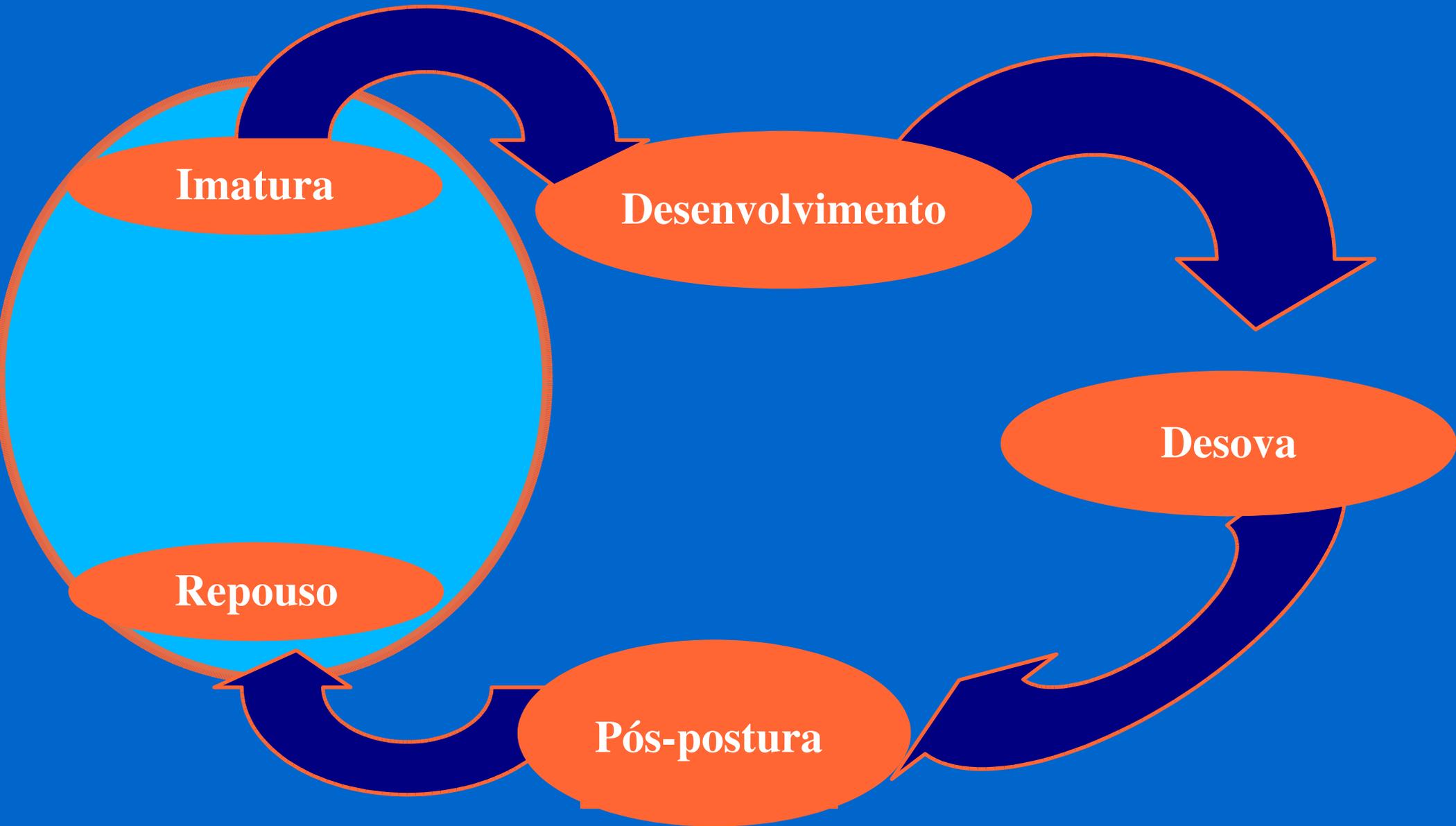
**Imatura**

**Repouso**

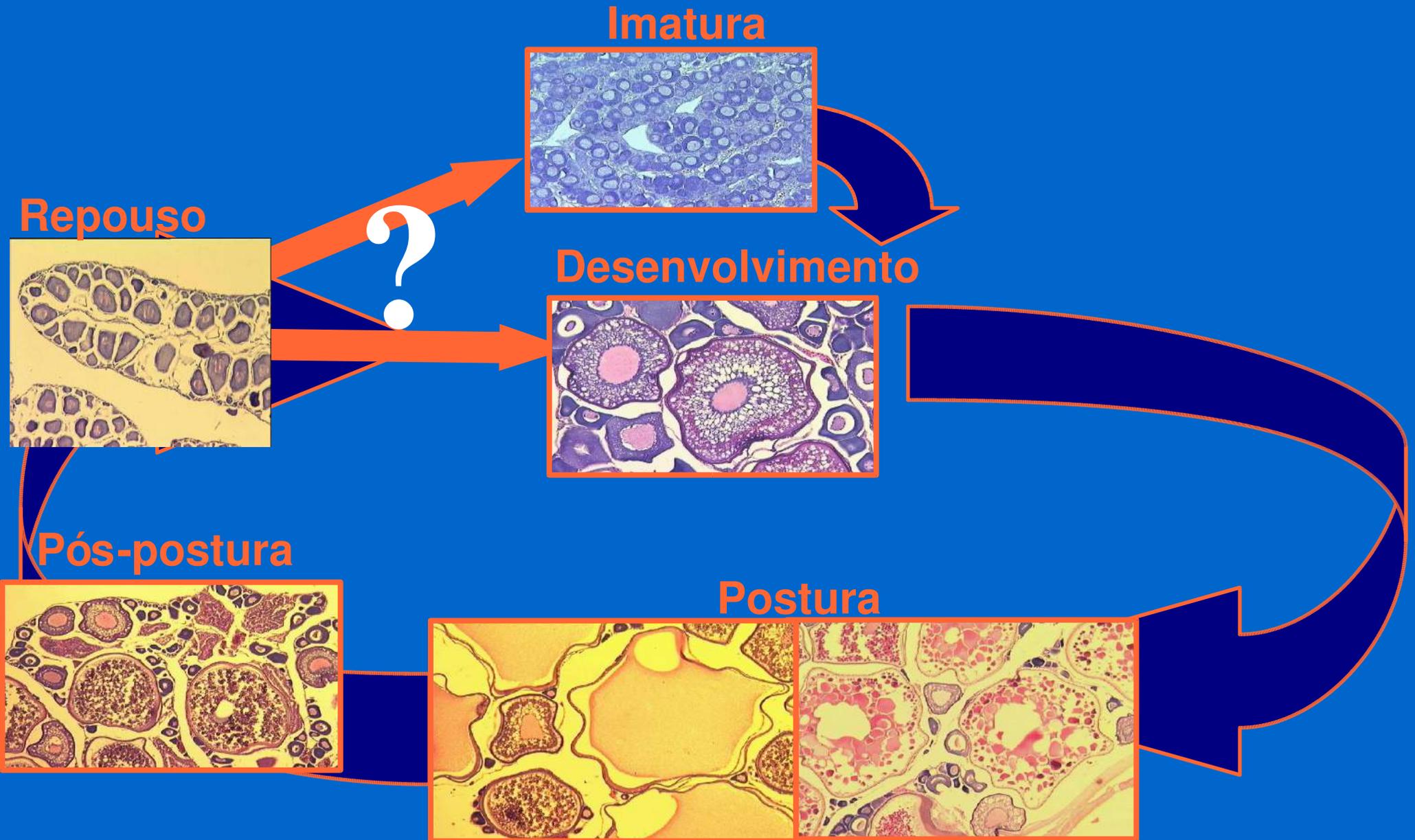
# Escala Macroscópica



# Escala Macroscópica

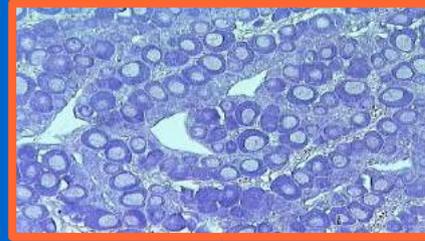


# Ciclo de maturação feminino microscópico:

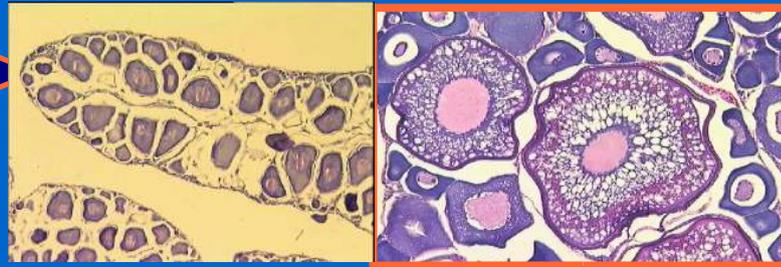


# Ciclo de maturação feminino microscópico:

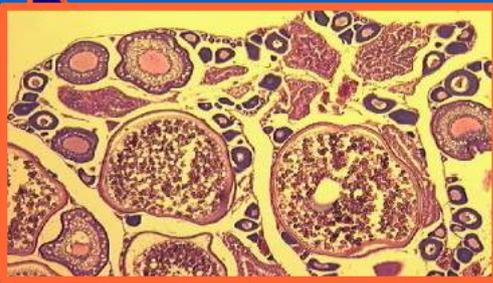
Imatura



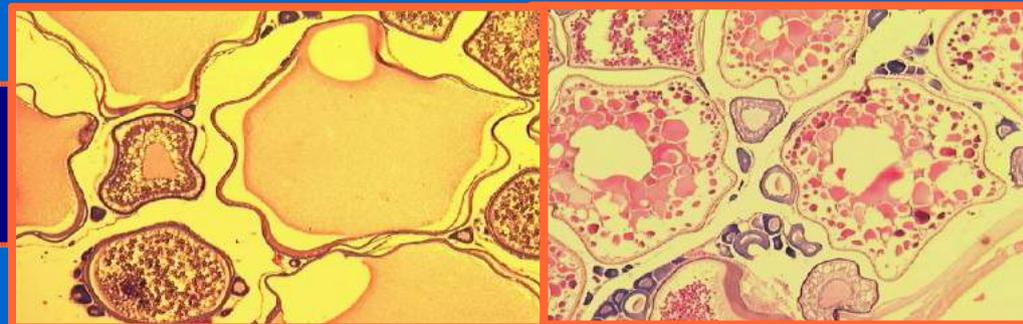
Desenvolvimento/Repouso



Pós-postura

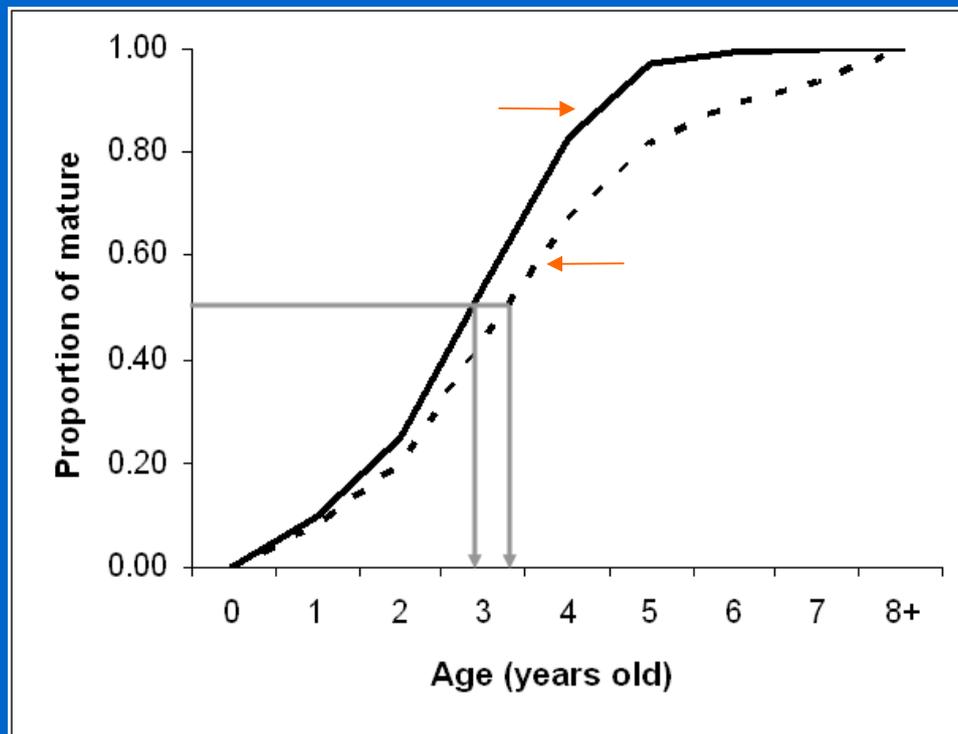


Postura



# Ogivas de Maturação

- Imatura/Repouso validar a atribuição macroscópica através da histologia



Morgado, C., Gonçalves, P. 2006.

How usefull histology can be?

The European Hake (*Merluccius merluccius*) case.

Gonad Histology Workshop (11-12 Julho 2006)

New Orleans, EUA.

## ANEXO 2 – VII

“Importância dos dados de reprodução na avaliação de stocks. Exemplo:  
Pescada” – Morgado, C., 2006

**Importância da histologia  
na avaliação de stocks  
Exemplo: Pescada**



**IPIMAR**

**Cristina Morgado**

## Avaliação de Stocks

### saber qual o estado de exploração do stock:

- Número de indivíduos
- Número de indivíduos adultos que vão contribuir para a manutenção do stock
- Estimativa de quantos indivíduos vão entrar para pescaria no próximo ano
- Stock se mantêm estável com o actual nível de pesca
- Etc.

### vários dados base necessários:

- Composição de comprimentos das capturas
- Chaves comprimento idades
- **Ogiva de maturação**
- Etc.

## Ogiva de maturação

Permite a estimação do stock de biomassa desovante (SSB)

qual a proporção de adultos que há no stock, ou seja quanto indivíduos contribuem para continuidade do stock

### Dados necessários:

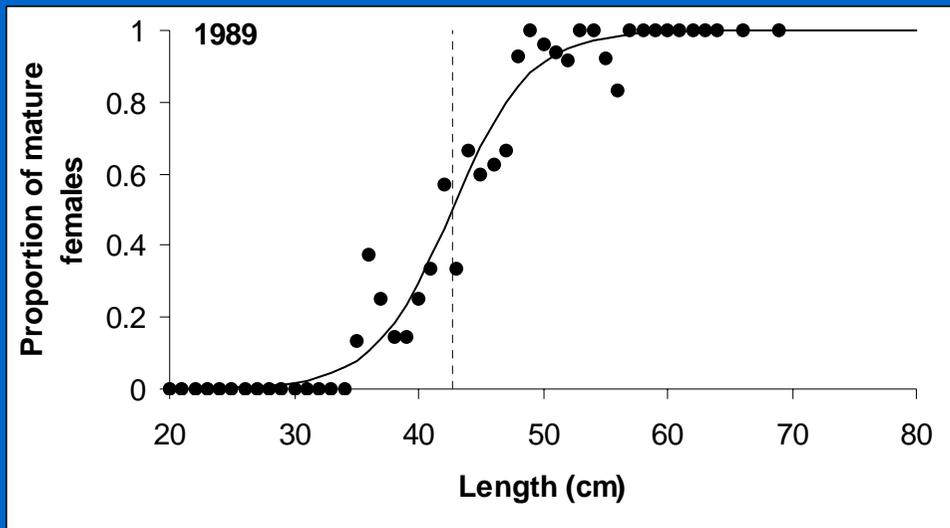
- Proporção de maduros/imaduros por classe de comprimento
- Chave de comprimento – idade
- Dados da época de reprodução

# Ogiva de maturação

Número de imaturos por classe de comp.

Número de maturos por classe de comp.

Proporção de maturos



Classe comp.(cm)	Imaturos (I)	Maturos (II,III &IV)	Proporção maturos	Número total
25	17	0	0.00	17
26	11	0	0.00	11
27	13	0	0.00	13
28	21	0	0.00	21
29	17	1	0.06	18
30	16	1	0.06	17
31	29	1	0.03	30
32	20	0	0.00	20
33	22	0	0.00	22
34	24	1	0.04	25
35	22	0	0.00	22
36	15	0	0.00	15
37	17	0	0.00	17
38	20	1	0.05	21
39	19	1	0.05	20
40	17	4	0.19	21
41	5	4	0.44	9
42	13	5	0.28	18
43	8	6	0.43	14
44	10	8	0.44	18
45	15	8	0.35	23
46	7	12	0.63	19
47	7	8	0.53	15
48	5	9	0.64	14
49	7	8	0.53	15
50	4	15	0.79	19
51	3	10	0.77	13
52	2	11	0.85	13
53	2	12	0.86	14
54	0	6	1.00	6
55	1	8	0.89	9
56	1	12	0.92	13
57	0	9	1.00	9
58	0	3	1.00	3
59	0	1	1.00	1
60	0	1	1.00	1

## Ogiva de maturação

Example of 2005 maturity ogive:

0	1	2	3	4	5	6	7	8+
0.00	0.19	0.39	0.55	0.68	0.87	0.95	0.99	1.00

Ao número de indivíduos idade/ano estima-se a biomassa de adultos

## Ogiva de maturação

Problemas quando há erros na identificação de maduros

A identificação de indivíduos maduros em repouso como imaturos

**Sub-estimação de SSB**

## Ogiva de maturação

Workshop de Maturação de Pescada – Abril 2006

6 em 20 fêmeas foram macroscopicamente classificadas como imaturas

dessa 6, pela análise histológica 3 eram imaturas e as outras 3 eram maduras em repouso

Importância da análise histológica na **validação** das ogivas de maturação

## Ogiva de maturação

Problemas em obter ogivas validadas:

- Obtenção de amostras frescas
- Custos inerentes ao processamento e análise histológica



**Trabalho financiado pelo projecto PNAB- Recolha de Dados**

**Obrigada**

## **ANEXO 2 – VIII**

“Tempo de espera entre a captura da sardinha e a fixação das gónadas” –  
Nunes, C., 2006

## **Tempo de espera entre a captura da sardinha e a fixação das gónadas...**

### ... E nomeadamente o seu efeito na correcta datação dos POFs

- Para esse efeito, durante o cruzeiro foram amostradas cerca de 30 sardinhas fêmeas logo após a captura, e depois 4h, 8h e 12h após a sua captura.
- Durante esses intervalos de tempo, a sardinha foi guardada na câmara fria, mimando as condições vividas a bordo das traineiras (sardinha misturada com gelo).
- As gónadas de todas essas fêmeas foram observadas histologicamente, avaliando a presença e idade dos POFs.
- O tempo médio de espera nos portos em 2005 foi de 6h21min, com um mínimo de 1h15min e um máximo de 15h30min.

→ do ponto de vista da qualidade do material histológico, não foi notada nenhuma diferença entre as várias amostras, não havendo assim uma degradação significativa dos tecidos (pelo menos visível histologicamente) se a sardinha for mantida nessas condições.

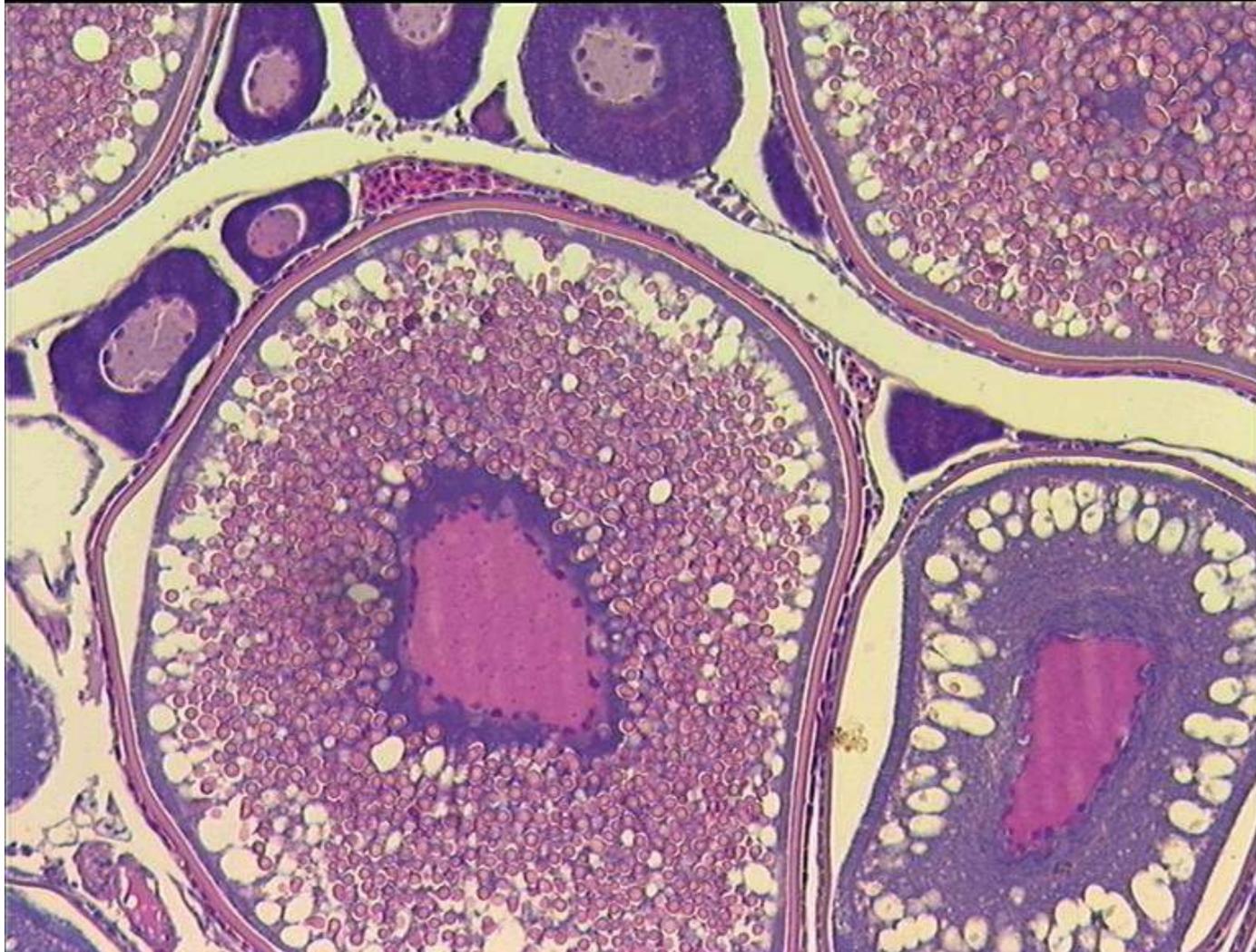
→ do ponto de vista dos POFs, esses são claramente identificáveis mesmo após 12h, e mesmo para os estados mais avançados dos POFs (idades  $\geq 3$  dias) (*ainda não foi feita a análise estatística dos resultados numéricos*)

## **ANEXO 2 – IX**

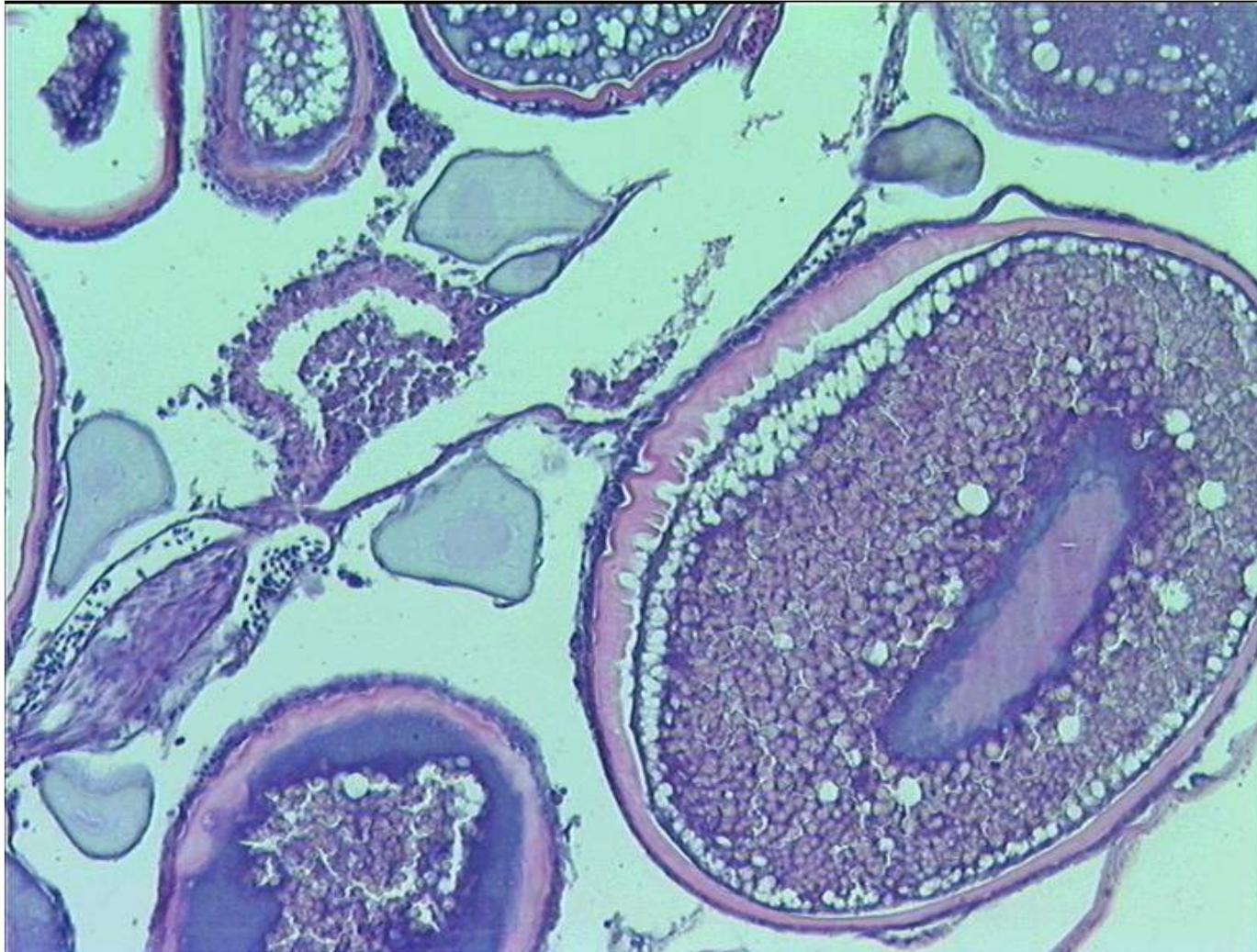
“Fixador usado para as gónadas de sardinha” – Nunes, C., 2006

## **Fixador usado para as gónadas de sardinha**

- Problema com as amostras provenientes da campanha de MPDO de 2005 (tanto dos portos como do cruzeiro): praticamente todas as amostras apresentavam os oócitos com os núcleos pouco visíveis (apenas se nota o contorno do lugar em que o núcleo deveria estar presente, mas nem a membrana nuclear nem o conteúdo nuclear, como por ex. os nucléolos, estão visíveis).
- Após se ter eliminado outras causas possíveis (coloração, material inclusão), decidiu-se examinar o tipo de fixador, visto ser este o único parâmetro distinguindo estes 4 anos de MPDO (1997, 1999: AFA; 2002, 2005: formol salino).
- Foram testadas então as seguintes condições de fixação com uma amostra de Peniche (PNAB), 6 gónadas de fêmeas para cada condição:
  - A. formol não tamponado, diluído com água do mar a 4%
  - B. formol tamponado com Borax, diluído com água do mar a 4%
  - C. formol tamponado com Borax, diluído com água destilada a 4%
  - D. formol tamponado com Borax, diluído com água destilada a 10%
- As conclusões preliminares sugerem que a água do mar interferirá de alguma forma com a fixação de certas estruturas celulares (ver fotos). É de notar também a necessidade de neutralizar o formol.



formol tamponado com Borax, diluído com água destilada a 4%



formol não tamponado, diluído com água do mar a 4%

## **ANEXO 2 – X**

“Histologia de gónadas de sardinha” – Nunes, C., 2006

# *HISTOLOGIA DE GÓNADAS DE SARDINHA*

Y. Stratoudakis, A. Silva, C. Nunes

Workshop Histologia IPIMAR,  
22-23 Novembro 2006 (NeoMav)

No passado...



- . Trabalho de J. Santos Pinto (IBM, anos 50): escala de maturação das gónadas de sardinha
- . Trabalhos da I. Figueiredo (INIP, anos 80 e 90): entre outros, o que decorreu da 1ª campanha do MPDO de sardinha em 1988
- . Desde 1997, trabalho de rotina apenas das amostras do MPDO (excepto casos pontuais)

Procedimento...



- . Fixação:
  - 1997, 1999: com AFA (tóxico, mas bons resultados)
  - 2002, 2005: com formol 4% em água do mar (mas problema)
- . Inclusão:
  - Essencialmente parafina, excepto 1999 (resina)
- . Coloração:
  - Hematoxilina-Eosina

Avaliar o tipo e a incidência de ATRÉSIA

→ possível indicador do fim da época de desova a nível populacional

→ possível indicador de condições ambientais e/ou fisiológicas adversas

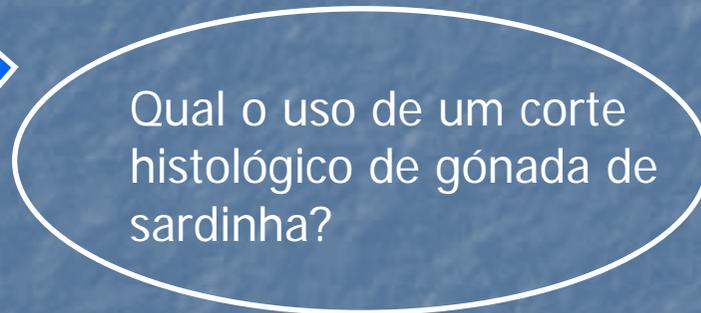
Determinar o ESTADO DE MATURAÇÃO

microscópico do indivíduo

→ validar o estado de maturação macroscópico

→ validar a separação de indivíduos maduros e imaturos (ver ogivas de maturação)

3



1

2



Avaliar a presença e a idade dos FOLÍCULOS PÓS-OVULATÓRIOS (POFs)

→ Determinar a fracção da população feminina desovante (ver MPDO)

→ Eliminação das fêmeas hidratadas com POFs na determinação da fecundidade parcial

# 1

## ESTADO DE MATURAÇÃO

Escala de maturação macroscópica/microscópica usada:

Pinto e Andreu (1957)

✓ Baseada essencialmente no estado do ovócito mais avançado presente no ovário

✓ 6 estados → I: repouso ou virgem

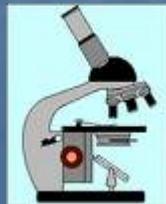
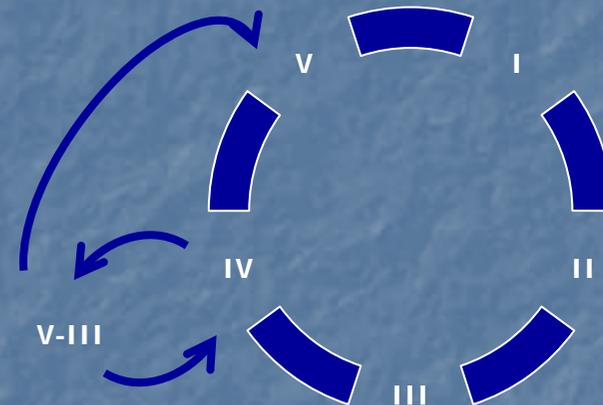
II: início desenvolvimento

III: pré-desova

IV: em desova

V-III ou VI: em recuperação

V: pós-desova



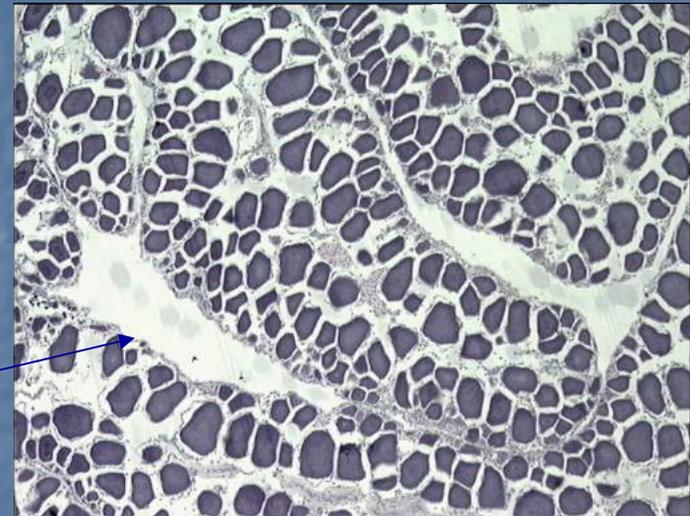
→ Proposta actual de fundir os estados III e V-III (difícil de distinguir microscopicamente, erros de classificação) (I. Afonso-Dias et al., subm.)

# 1 ESTADO DE MATURAÇÃO

→ Mantém-se o problema da distinção dos indivíduos virgens dos em repouso

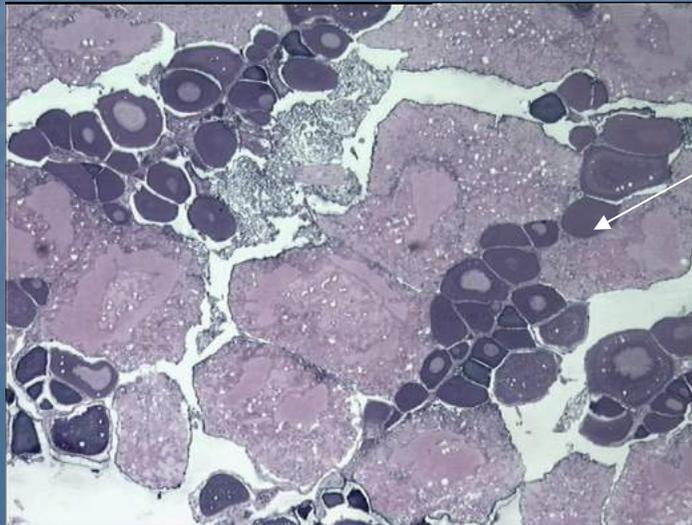


Virgem (Juvenil,  
Nov 2002)

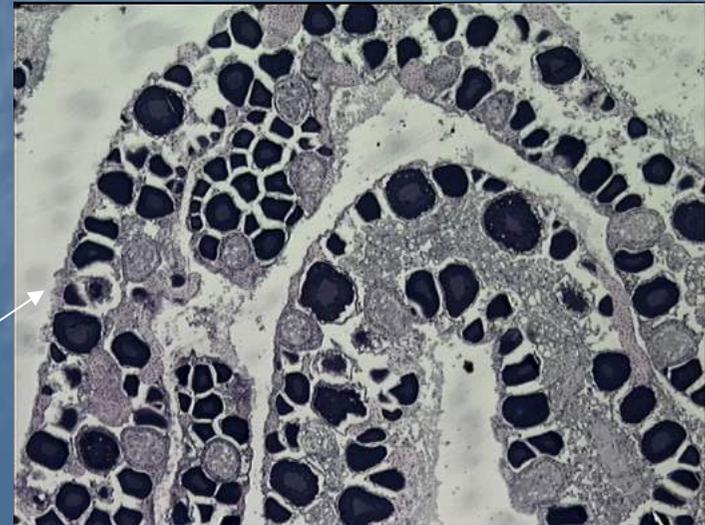


Em repouso  
(Adulto, Set 2002)

→ O estado 5 pode ter aspectos muito diferentes (tipos de ovócitos)



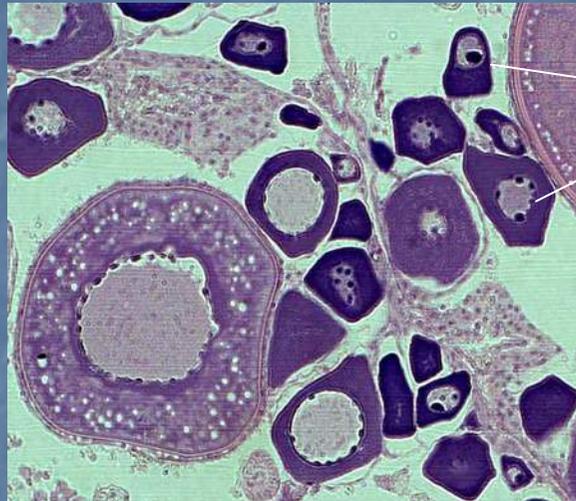
Ovócitos vitelados  
mas todos  
atréticos



Ausência de  
ovócitos  
vitelados, atresia

# 1

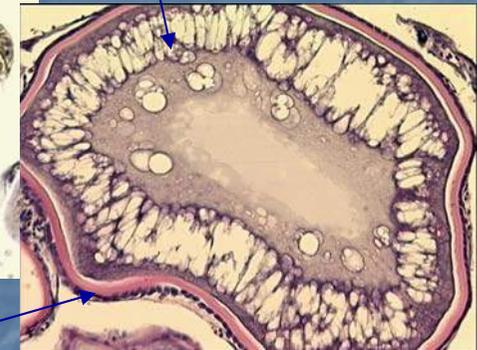
## ESTADO DE MATURAÇÃO



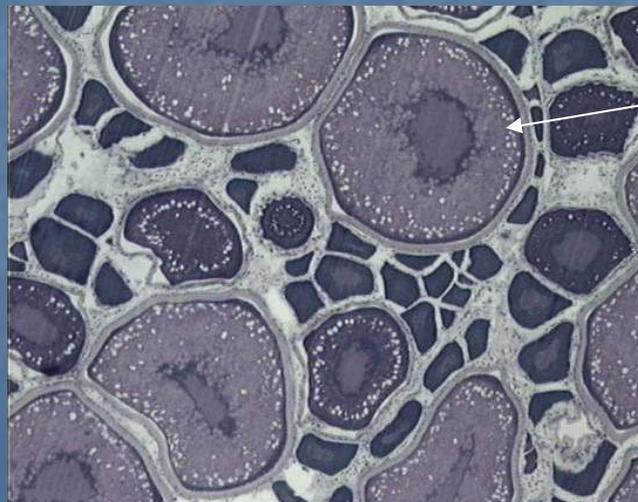
Ovócitos prévitelogénicos  
("chromatin nucleolar" e "perinucleolar")



Zona radiata zona pellucida  
ou chorion ou envelope vitelino



Ovócitos prévitelogénicos  
Alvéolos corticais (glicoproteínas) e primeiras inclusões lipídicas



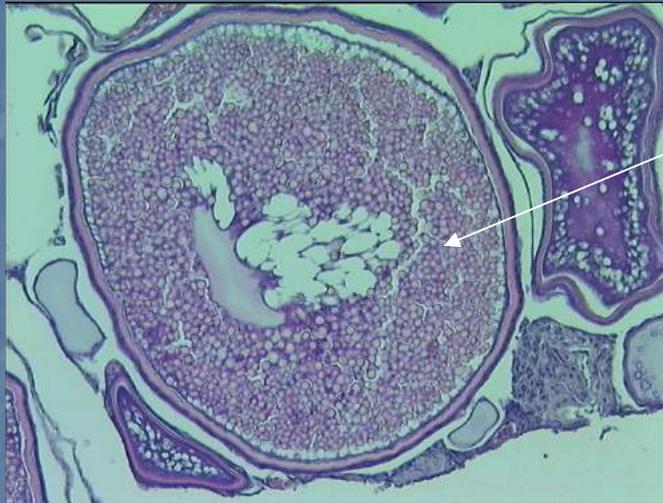
Ovócitos vitelados  
Acumulação de inclusões de vitelo (glicolipoproteína) e lipídicas



Acumulação das inclusões lipídicas à volta do núcleo

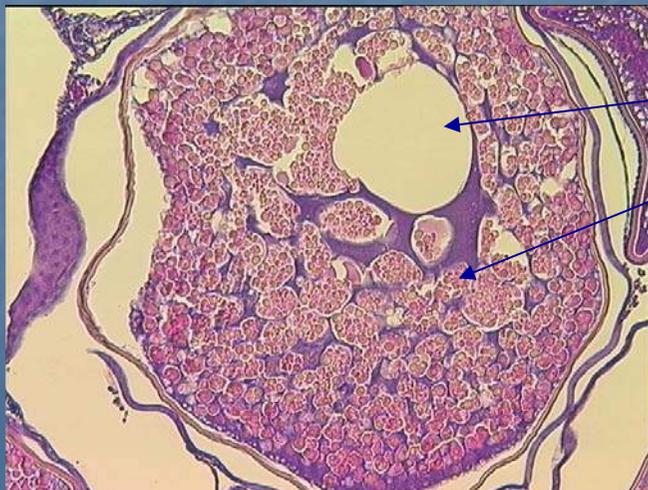
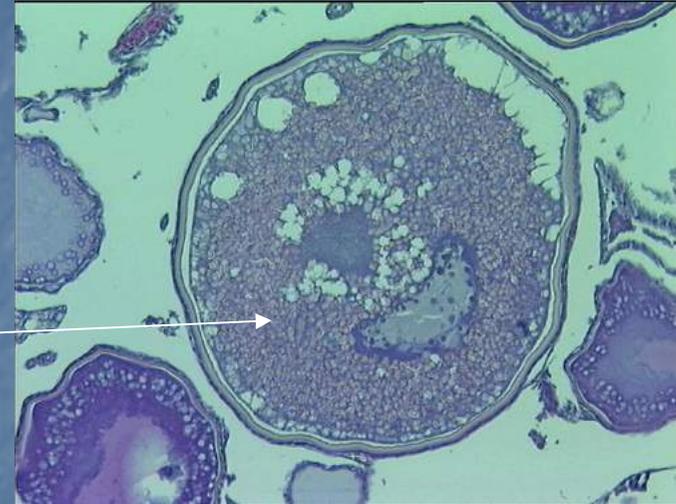
# 1

## ESTADO DE MATURAÇÃO



Início migração nuclear

Migração nuclear

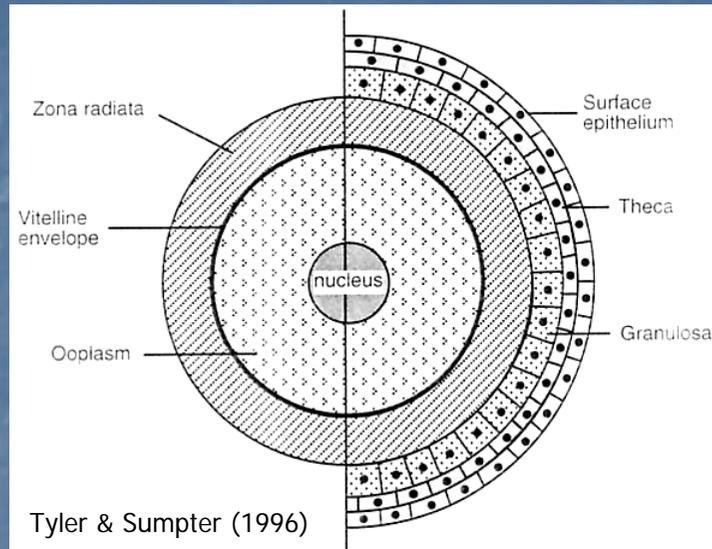


Fusão das inclusões lipídicas numa só gota lipídica, e início da fusão das inclusões de vitelo em placas vitelinas

Início hidratação



## 2 POFs



→ Ovulação/Desova (do óvulo rodeado pela zona radiata)

→ Permanece no ovário o folículo pós-ovulatório (POF) ↔ essencialmente granulosa (epitelial) e teca (conjuntivo)

→ Estrutura que degenera rapidamente (duração de vida de apenas alguns dias) nos pequenos peixes pelágicos (Saidapur 1982)

→ Identificar um POF e determinar a idade do POF ↔ determinar quantas fêmeas desovaram por dia, e em que dia cada uma delas o fez

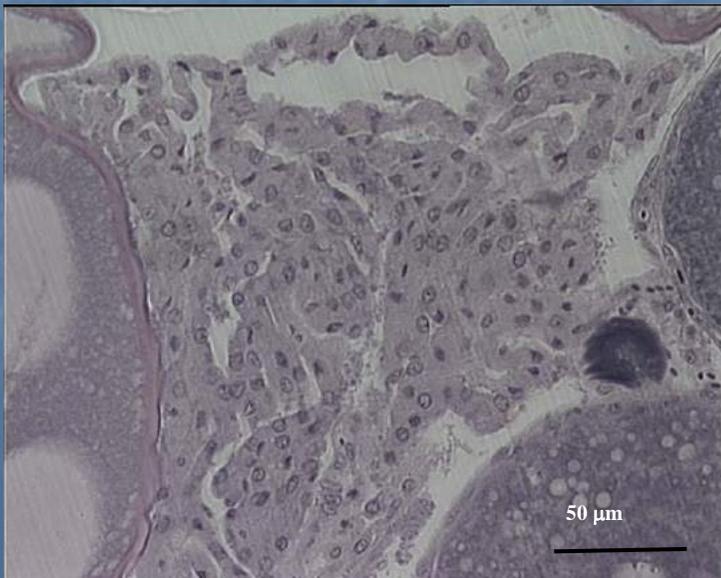
No passado...

- Trabalho de Pérez et al. (1992) (experiência de desova artificial em laboratório) → POFs com idade > 61h ainda identificáveis

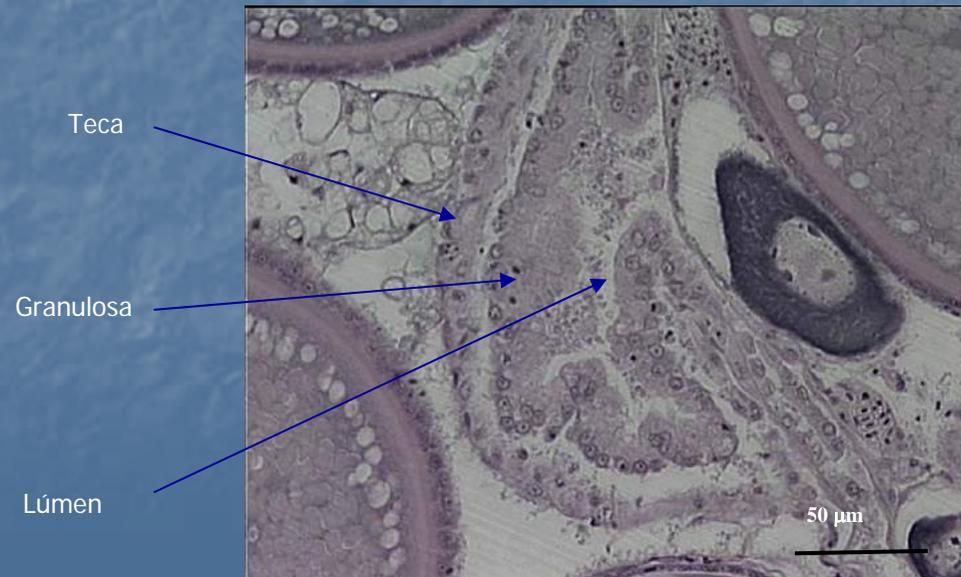
## 2 POFs

Mais recentemente...

- Trabalho de C. Espírito Santo (2004) com as amostras de resina do MPDO 1999
  - elaboração de uma escala histomorfológica + a hora da captura da amostra + hora média de postura da sardinha na costa portuguesa (~ 19h-20h, Ré et al. 1990) = idade presumível do POF
  - 7 estados: "Dia-0" e "Dia-1" facilmente identificáveis, dias seguintes mais difíceis; mas "Dia-0" não usado no cálculo da fracção desovante (possível "enviezamento" na captura)



POF com apenas algumas horas



POF com cerca de meio-dia

## 2 POFs



POF com cerca de 1 dia

Início da degeneração das células da granulosa (núcleos picnóticos, estruturas ovais ou "vacúolos")

Disposição regular das células da granulosa desaparece, assim como o lúmen, POF mais compacto

Teca



POF com cerca de 1 dia e meio ou 2



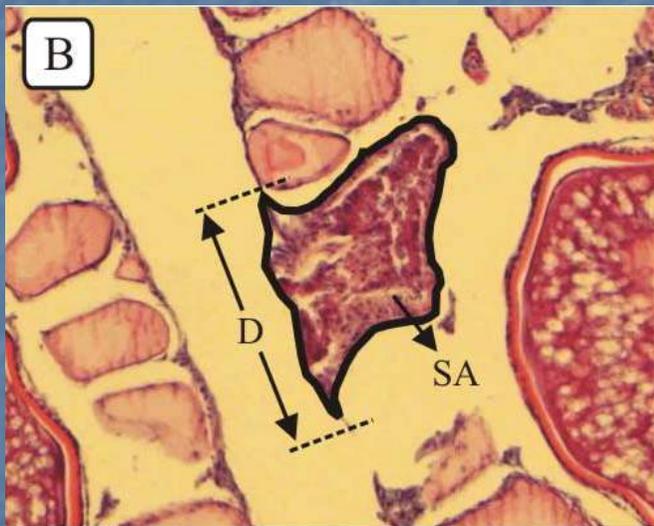
Granulosa já muito reduzida, teca dominante, forma triangular característica

POF com 3 dias ou mais

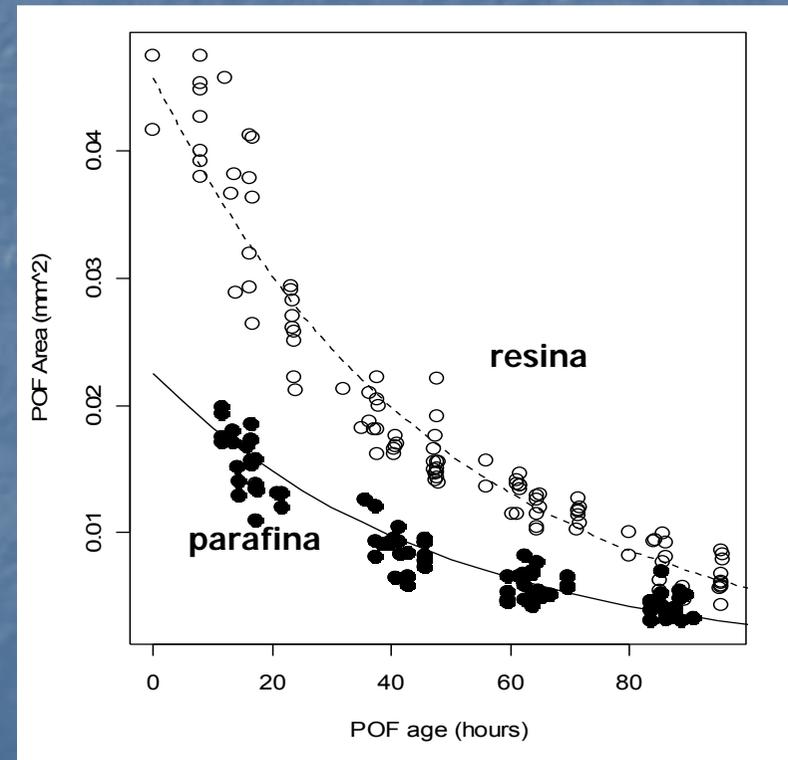
## 2 POFs

Mais recentemente...

- Trabalho de K. Ganas et al. (in press) com as amostras dos MPDO anteriores  
→ o POF é uma estrutura em degeneração, reabsopção, e contracção →  
hipótese: seu tamanho = função ( sua idade)



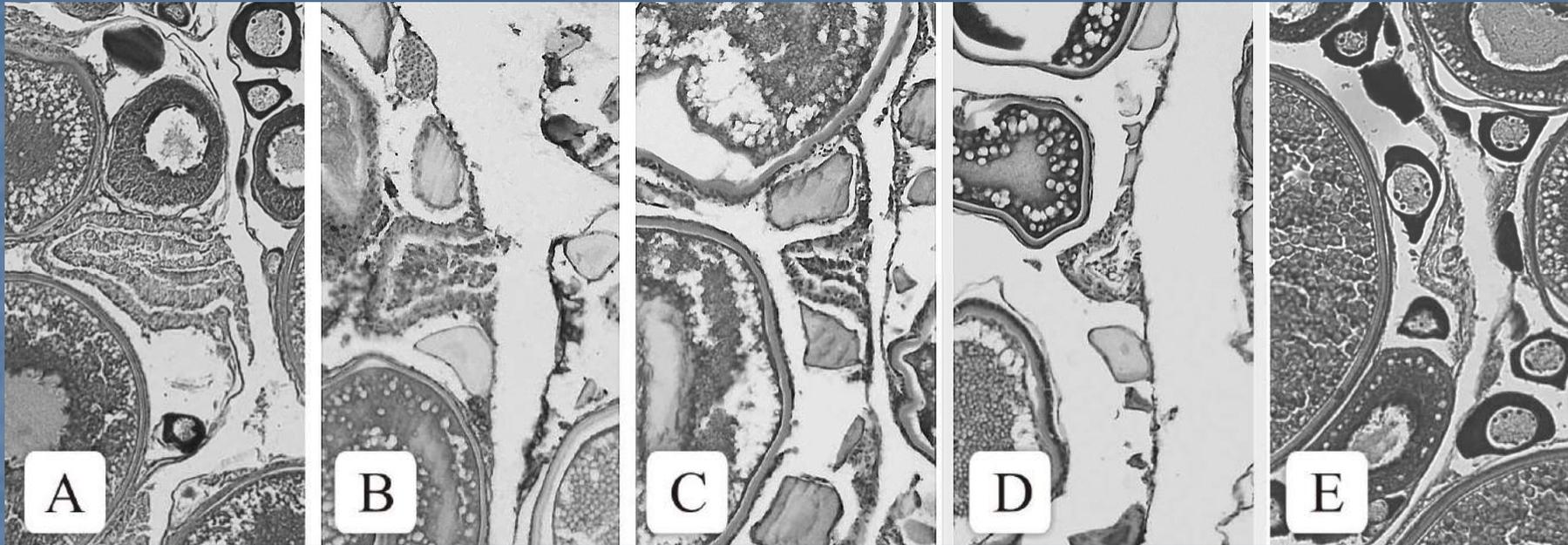
Numa imagem digital, medida da área do POF situado no limite de uma lamela do ovário



O POF diminui de cerca de 50% o seu tamanho (área) por dia

## 2

## POFs



"Dia-0"

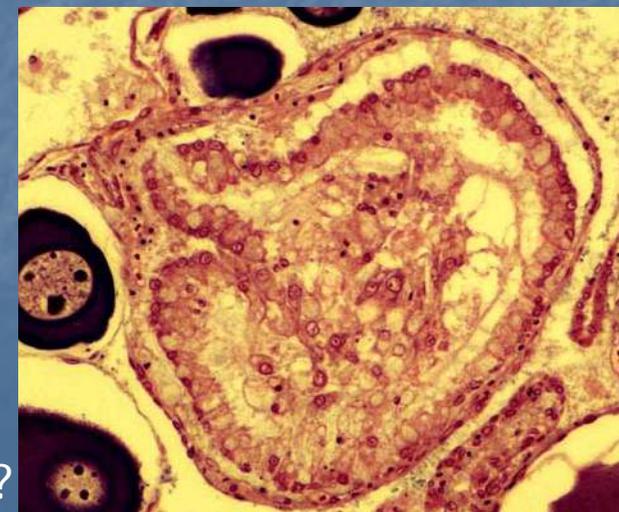
"Dia-1"

"Dia-2"

"Dia-3" ou mais

Actualmente, usa-se na datação dos POFs de sardinha uma combinação dos dois tipos de critérios: morfológicos e biométricos

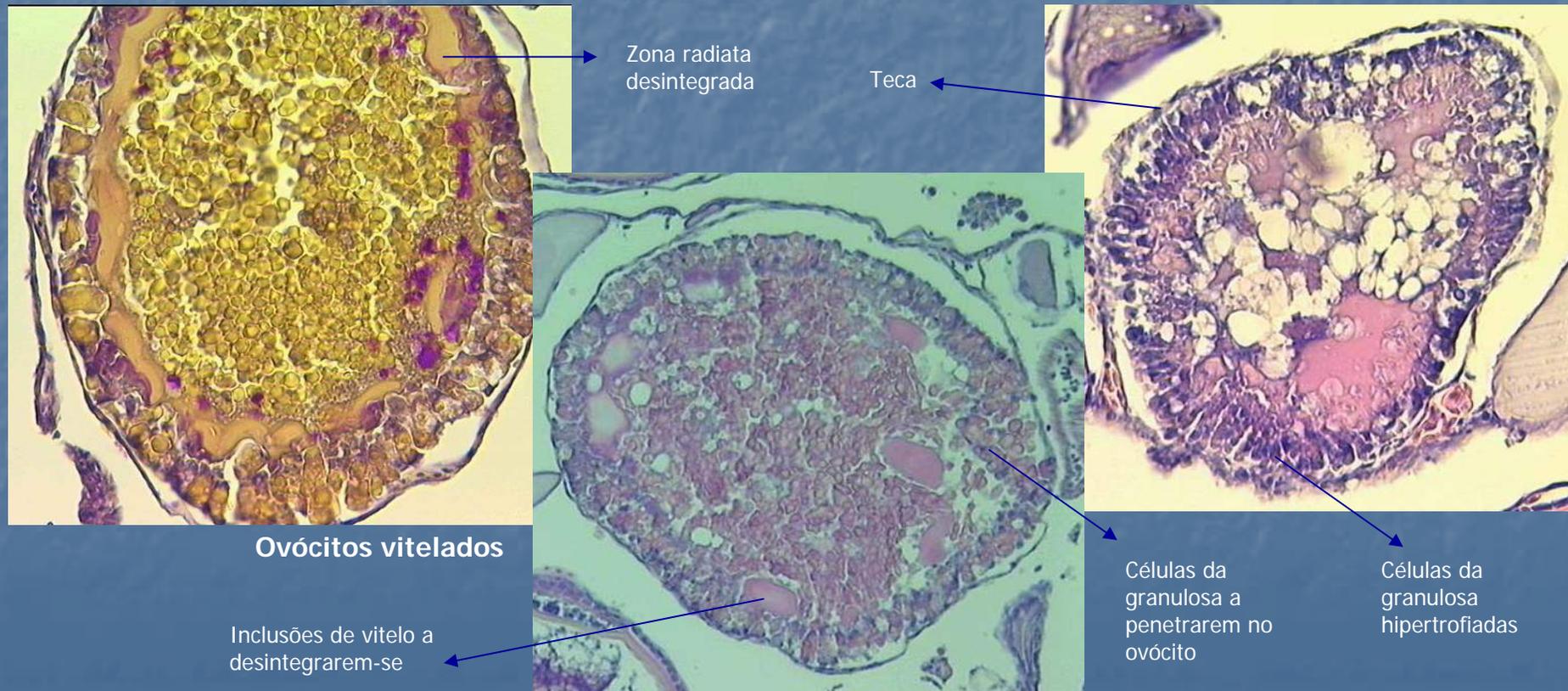
Atenção!!!: confusão com atresia  
→ possível utilização do PAS para distinguir os dois tipos de estruturas?



### 3 ATRESIA

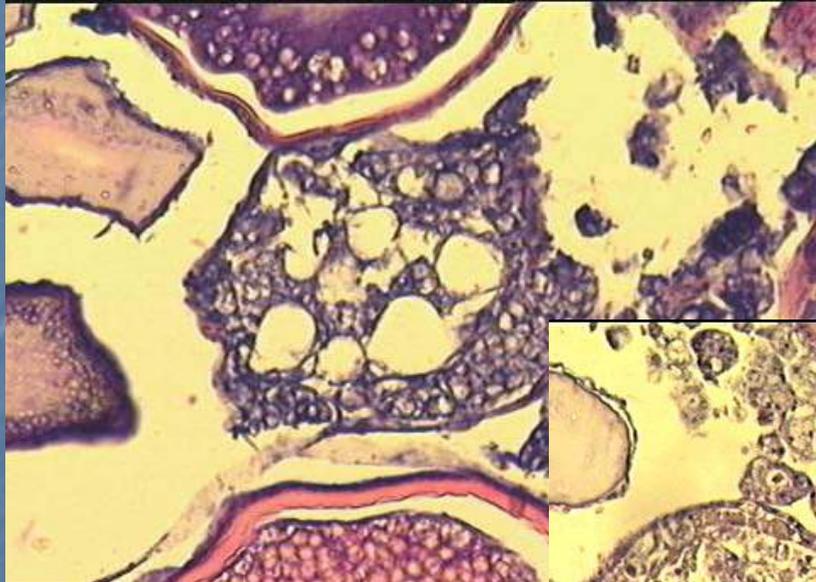
Na descrição de Hunter & Macewicz (1985) na anchova, e de Pérez & Figueiredo (1992) na sardinha, 4 tipos de atresia ou de folículos préovulatórios atréticos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ):

- ✓  $\alpha$  (ovócitos vitelados): desintegração da zona radiata, invasão do ovócito pelas células da granulosa hipertrofiadas, fagocitose do vitelo pelas células da granulosa
- ✓  $\alpha$  (ovócitos pré-vitelados): *idem*, mas sem absorção do vitelo

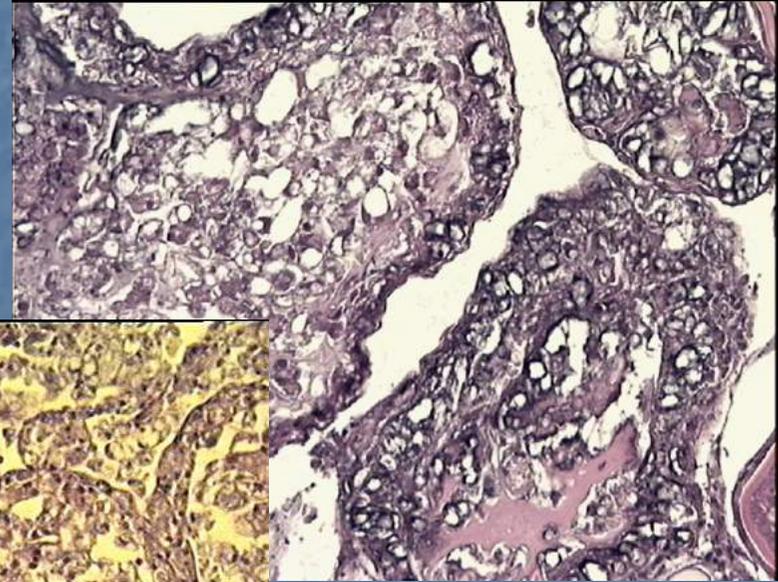


### 3 ATRESIA

✓  $\beta$  : absorpção do vitelo já completa, estrutura compacta de células da granulosa desorganizadas e algumas a degenerar, rodeada por uma fina camada de teca vascularizada, por vezes alguns largos vacuolos (antigas gotas lipídicas)

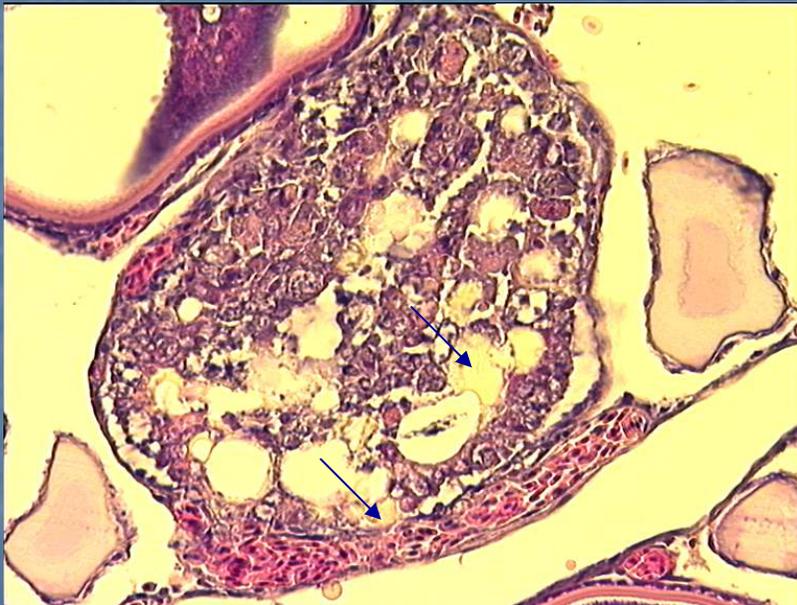


?

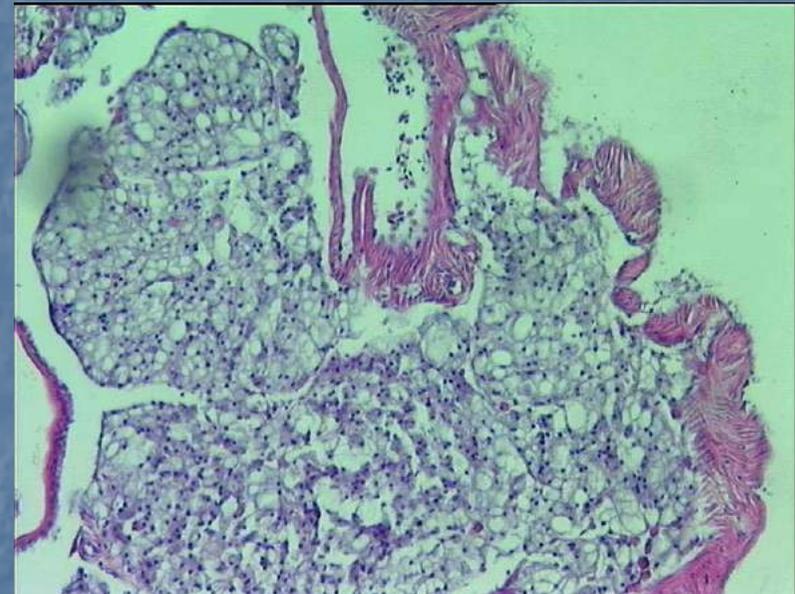


### 3 ATRESIA

✓  $\gamma$  : caracterizado pela presença de material cor amarelo-claro



✓  $\delta$  : folículo atrético bastante reduzido, semelhante a uma rede filamentosa, com ainda alguns núcleos picnóticos, ausência de largos vacuolos, por vezes pigmentação amarelo escura (lipofuscina?)



?





É tudo.

Agradecimentos:

Equipas técnicas dos últimos anos

**ANEXO 2 – XI**

“Histologia de estruturas do sistema reprodutivo em quatro espécies de raias”

– Pereira, B. S., 2006

# Histologia de estruturas do sistema reprodutivo em quatro espécies de raia

Bárbara Serra-Pereira<sup>1</sup>

Ivone Figueiredo<sup>2</sup>

Leonel Serrano Gordo<sup>1</sup>

1



2



EU Data Collection/PNAB

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

# Introdução

- As raias pertencem à Família Rajidae (SKA):
  - Espécies ovíparas;
  - Fecundação interna;
  - Embriões encapsulados (cápsula de natureza proteica);
  - Estimativa da duração média do embrião no útero materno: 0.5 a 2 dias;
  - Tempo de incubação após a extrusão: 3 a 8 meses.



*Leucoraja naevus*

# Espécies de raia

Nome científico:  
***Raja clavata***  
(RJC)

Nome comum:  
**Raia Lenga**



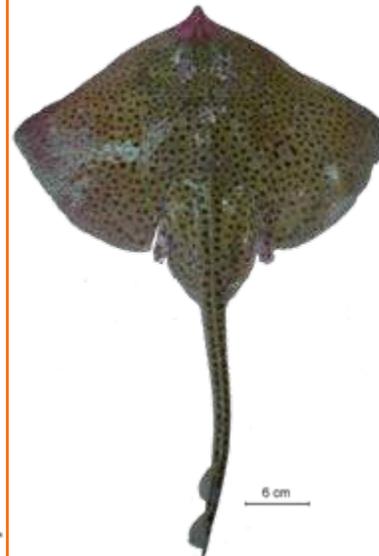
Nome científico:  
***Leucoraja naevus***  
(RJN)

Nome comum:  
**Raia S. Pedro**  
**Raia-2-olhos**



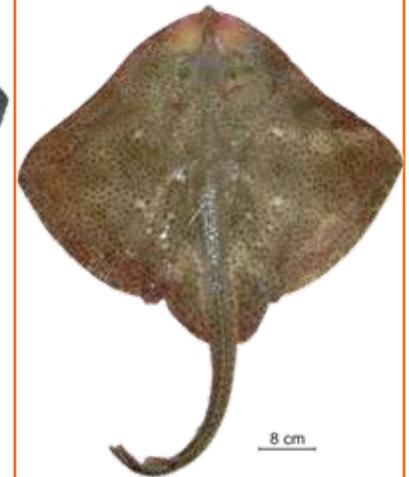
Nome científico:  
***Raja montagui***  
(RJM)

Nome comum:  
**Raia manchada**



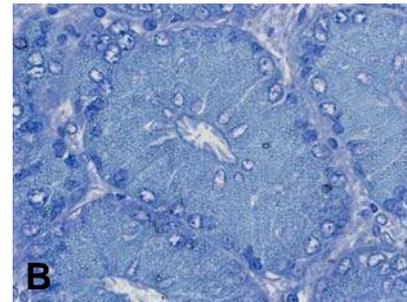
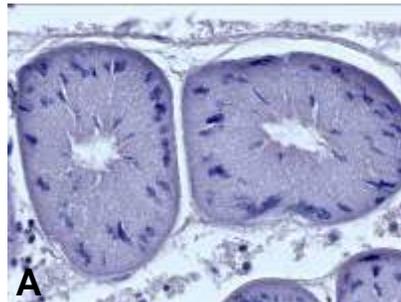
Nome científico:  
***Raja brachyura***  
(RJH)

Nome comum:  
**Raia pontuada**



# Material e Métodos

- Histologia
  - Fixação: formalina 10% tamponada
  - **A.** Impregnação em parafina (IPIMAR):
    - Cortes: 5  $\mu\text{m}$
    - Coloração: Hematoxilina-eosina (H&E)
  - **B.** Impregnação em resina (FCUL):
    - Cortes: 3  $\mu\text{m}$
    - Coloração: Azul toluidino (AT)



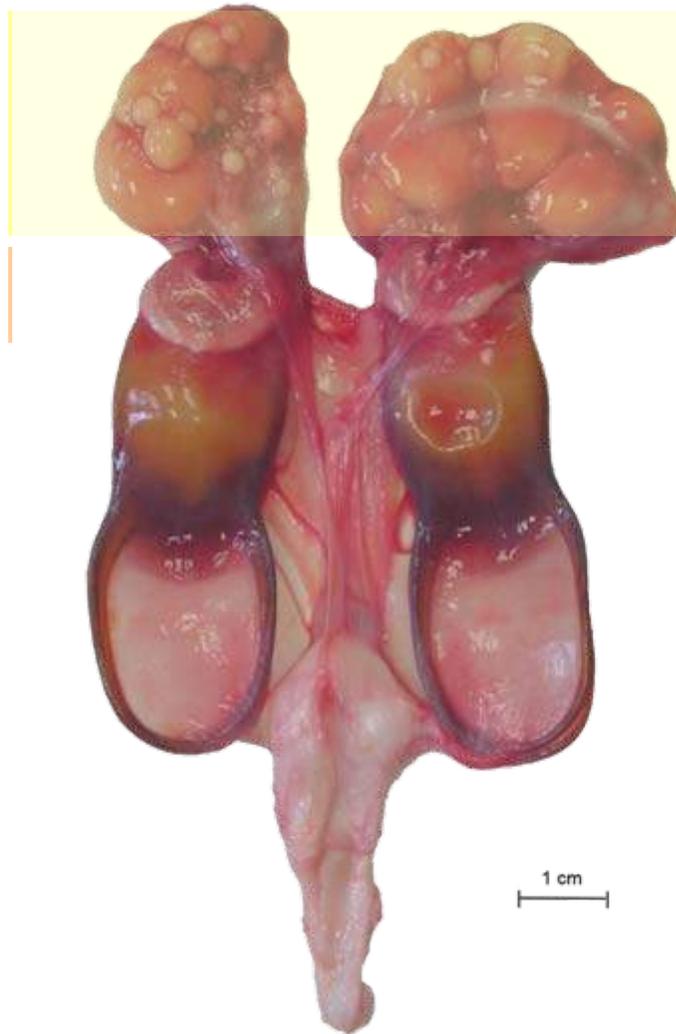


**FÊMEAS**

---

# Sistema Reprodutivo

Ovário

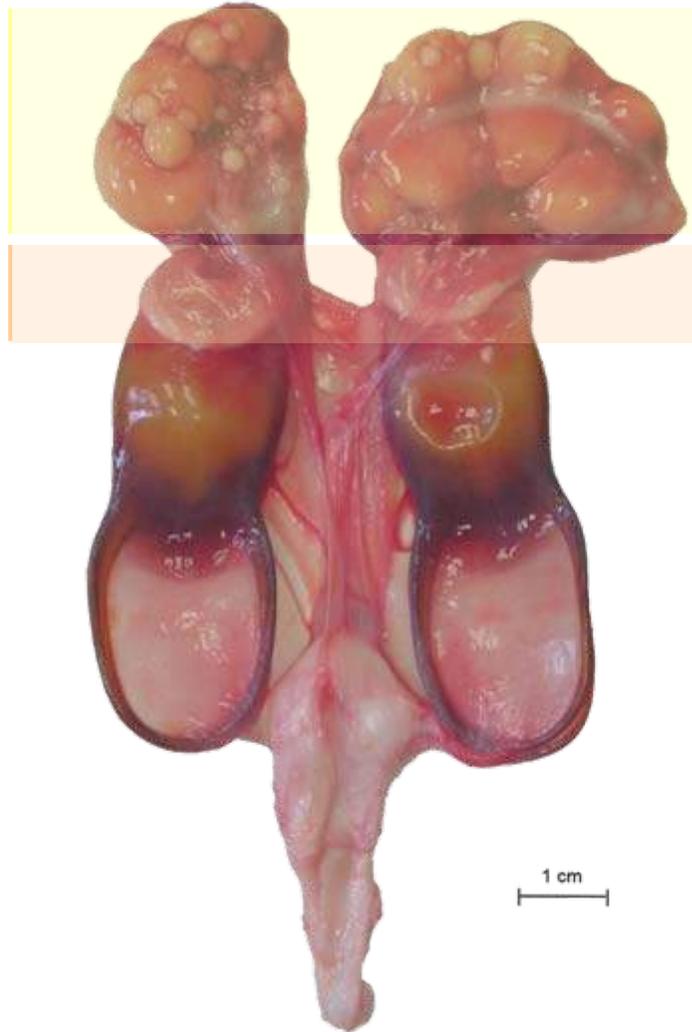
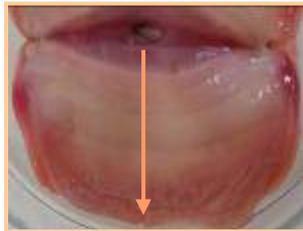


- Oócitos em diferentes fases de desenvolvimento  
Diâm. Max. 4 cm
- Histologia:
  1. Validação das escalas de maturação macroscópica
  2. Compreender a dinâmica do processo maturativo (Folículos pós-ovulatórios (POF); atresia)

# Sistema Reprodutivo

Ovário

Glândula Oviducal  
(GO)

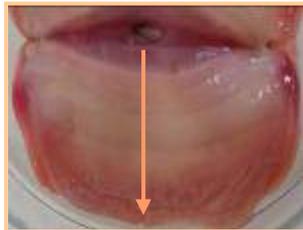


- Órgão onde ocorre:
  1. Fertilização
  2. Armazenamento de esperma
  3. Secreção de *jelly* e cápsula (estimulação endócrina)
- Histologia:
  1. Caracterização e identificação das zonas da glândula
  2. Identificação das estruturas de armazenamento de esperma

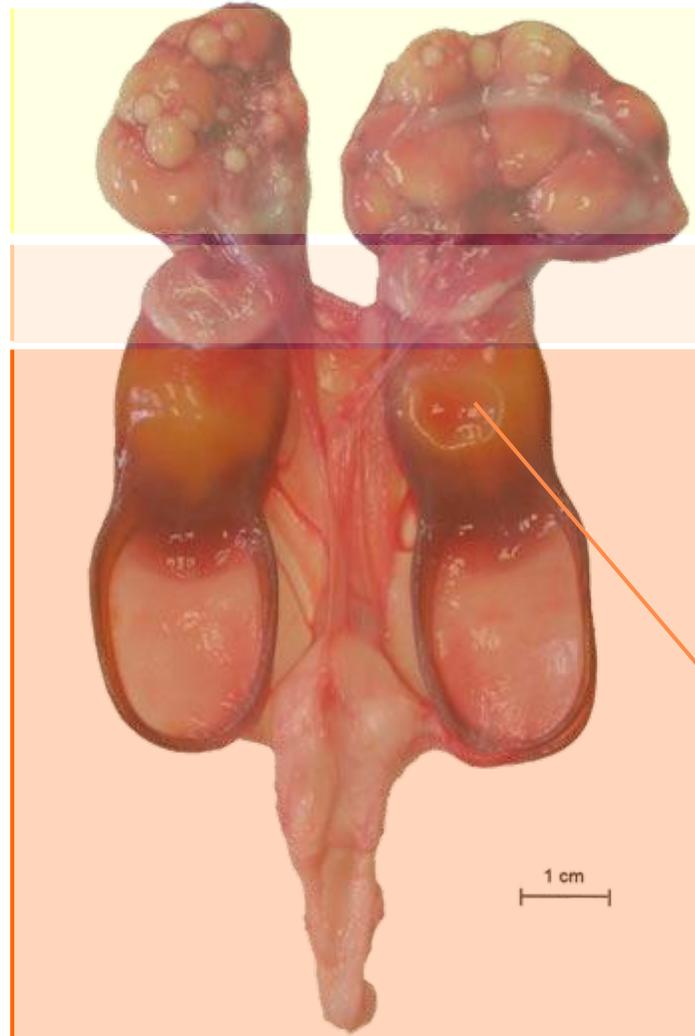
# Sistema Reprodutivo

Ovário

Glândula Oviducal  
(GO)



Útero



- O útero recebe o embrião encapsulado e transporta-o para o exterior

- Histologia:
  1. Caracterização e identificação das zonas do útero
  2. Estimação da época máxima de extrusão.

Embrião encapsulado

# Escala de maturação

- **Estados ováricos**

**1. Imaturo**



**2. Em maturação**



**3. Maduro**



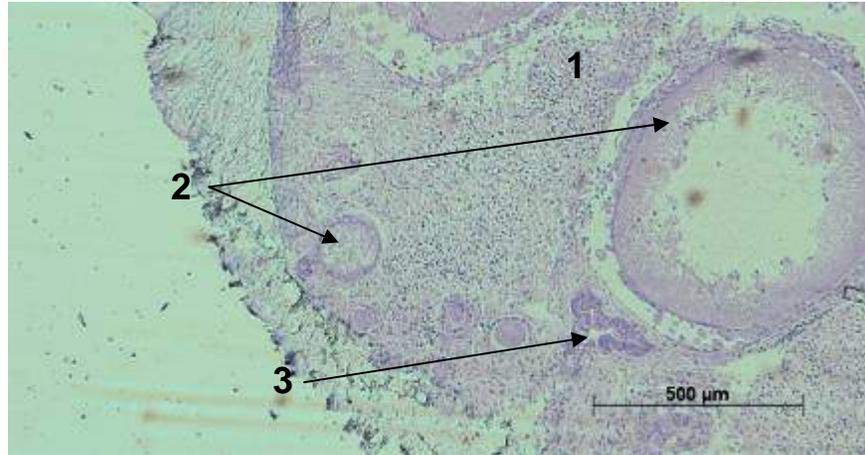
- **Estados Uterinos**

**4. Activo:** ovo nas trompas, início da formação da cápsula.

**5. Avançado:** cápsula em formação.

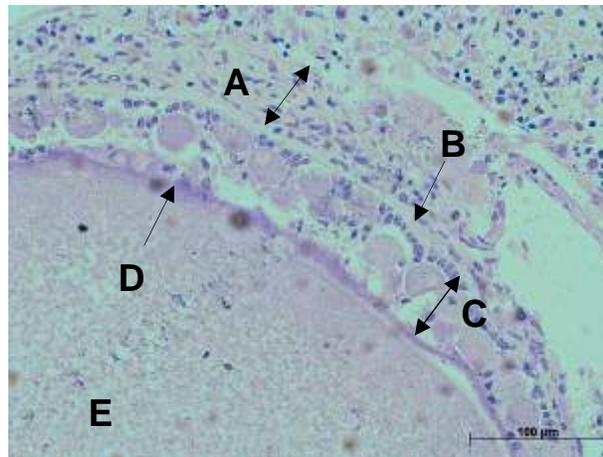
**6. Extrusão:** cápsula completamente formada.

# Ovário: organização



RJC. H&E. 40x

1. Zona germinativa
2. Folículos ováricos
3. POF/atresia

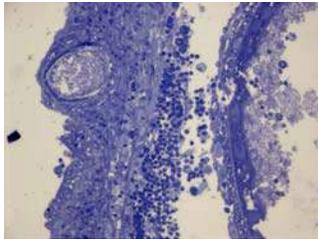


RJC. H&E. 200x

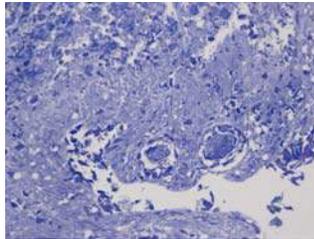
- A. Teca folicular
- B. Membrana basal
- C. Epitélio folicular/granulosa
- D. Zona *pellucida*
- E. Oócito

# Ovário: oogénese

## Folículo primário



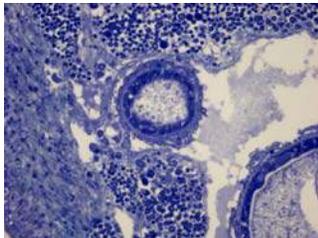
RJH. AT. 200x



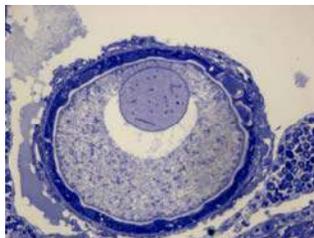
RJM. TB. 200x

- Oócito rodeado por uma camada folicular.
- Epitélio folicular simples

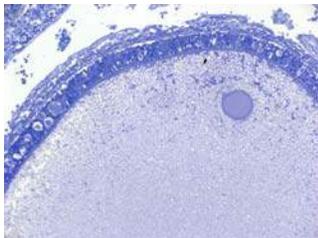
## Folículo secundário



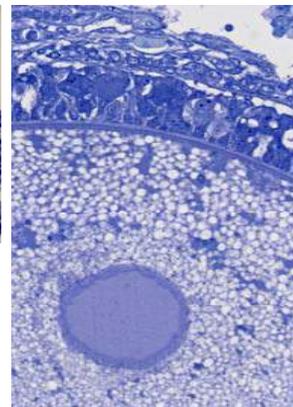
RJH. AT. 200x



RJH. AT. 200x



RJH. AT. 100x

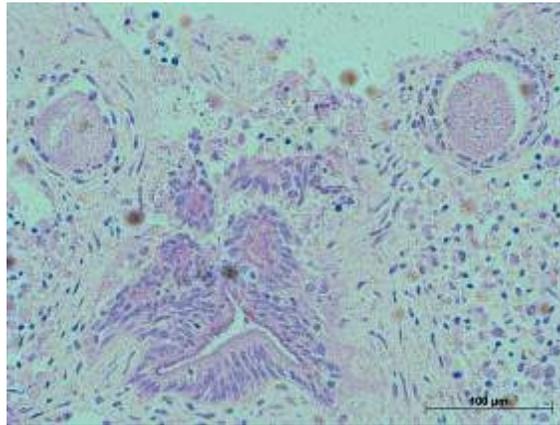


RJH. AT. 400x

- Epitélio folicular pseudoestratificado (células de tipo colunar)
- Espessamento da parede folicular (teca e epitélio folicular)

# Ovários: POF

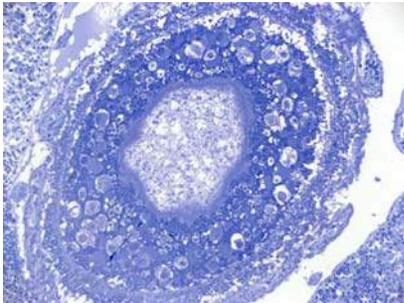
---



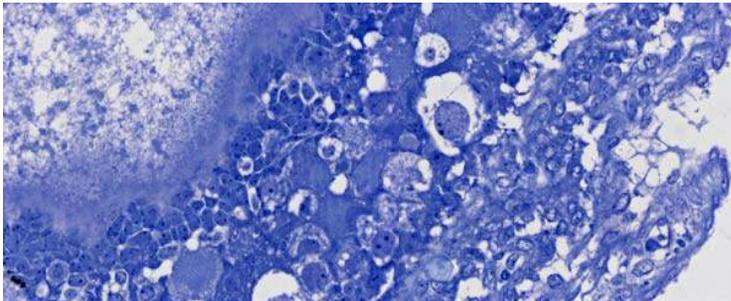
RJC. H&E. 200x

# Ovário: **atrésia**

## Fase inicial



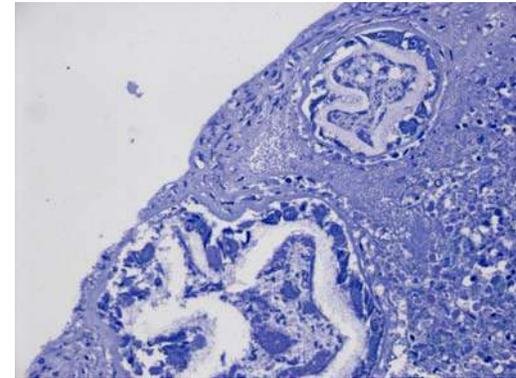
RJH. AT. 100x



RJH. AT. 400x

- Proliferação de células da granulosa para o interior do folículo ovárico
- Alteração da estrutura do oócito

## Fase avançada

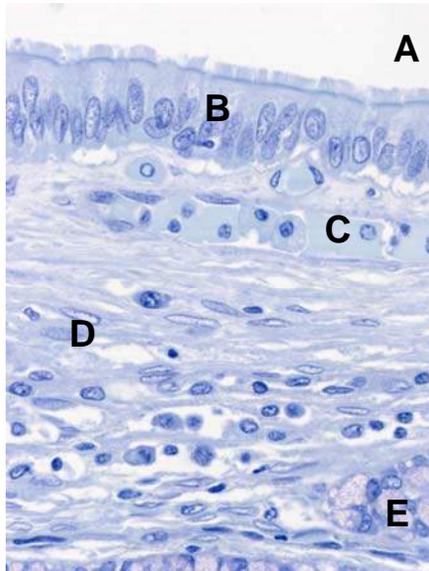


RJN. AT. 200x

- Nível elevado de degeneração do oócito

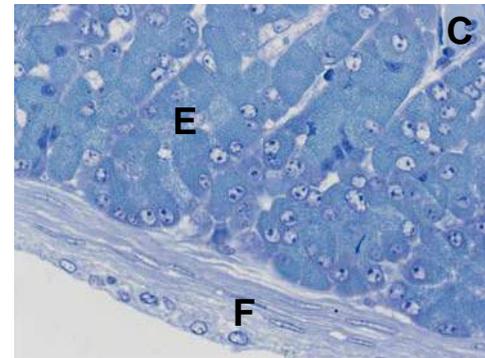
# GO: superfície

## Superfície interna



RJC. AT. 400x

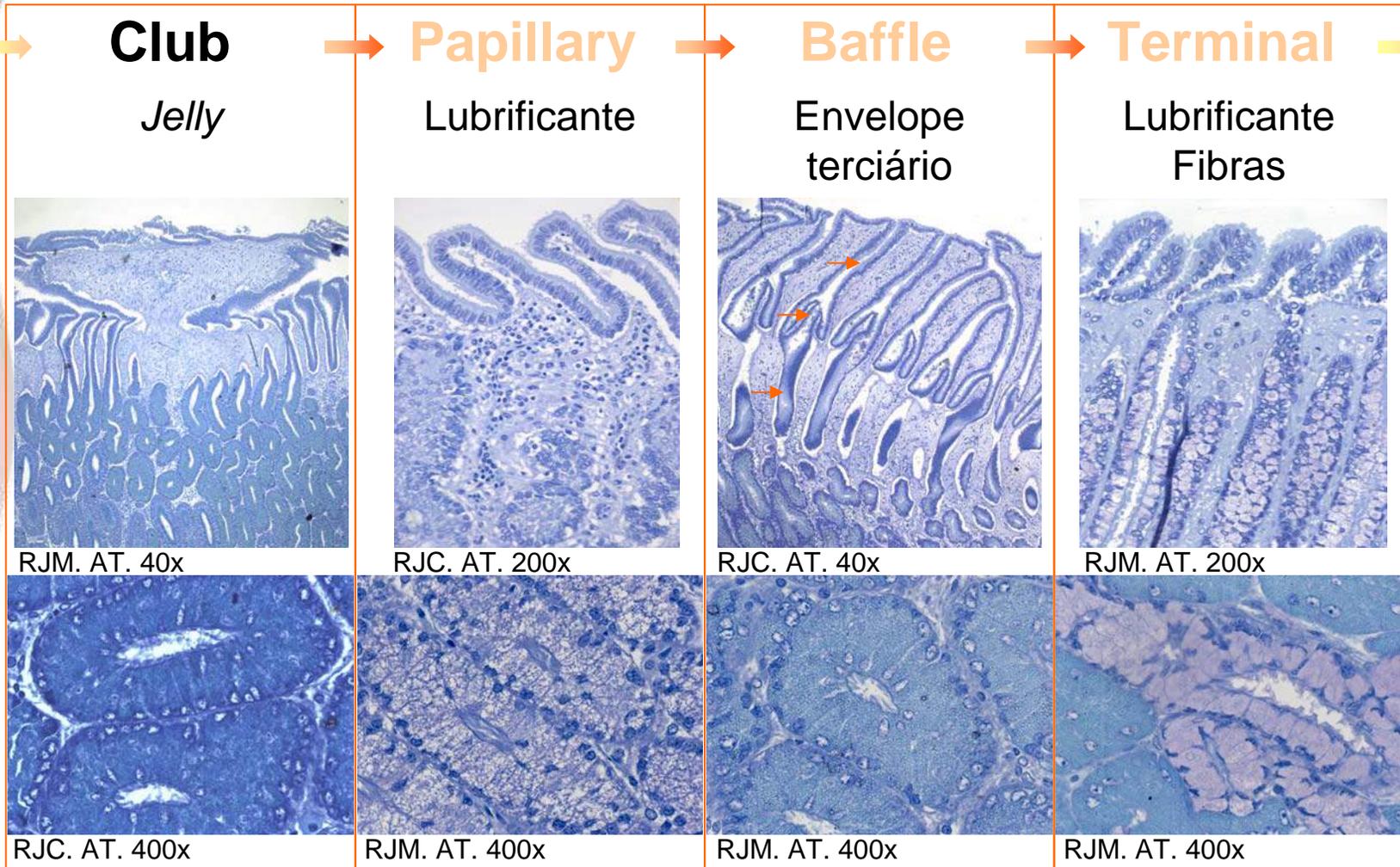
## Superfície externa



RJM. AT. 400x

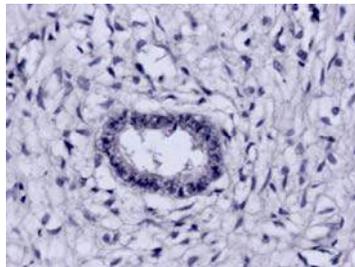
- A. Lúmen
- B. Epitélio colunar ciliado**
- C. Vaso sanguíneo
- D. Tecido conjuntivo laxo
- E. Túbulo glandular
- F. Tecido muscular liso**

# GO: zonas

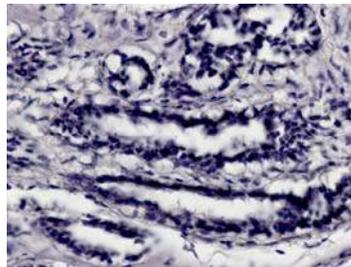


# Microestrutura: análise

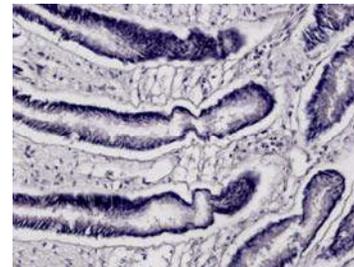
- As zonas da glândula oviducal formam-se durante o estado Em Maturação



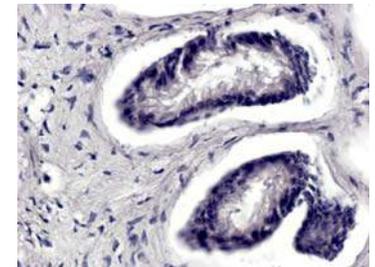
**Club**



**Papillary**

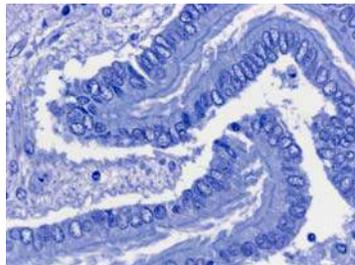


**Baffle**

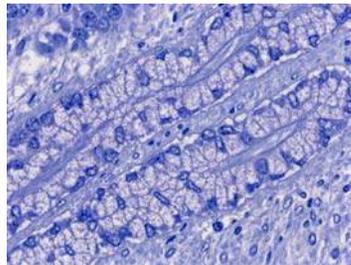


**Terminal**

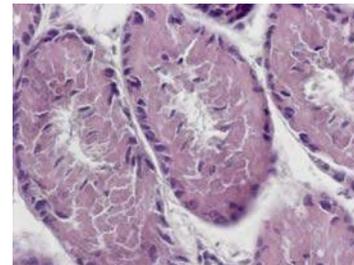
- No estado Maduro já se encontram totalmente formadas mas sem secreções no lúmen



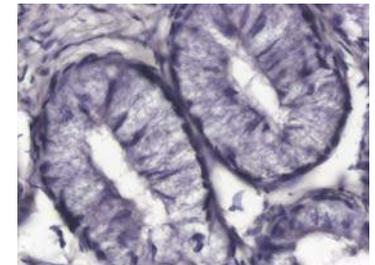
**Club**



**Papillary**



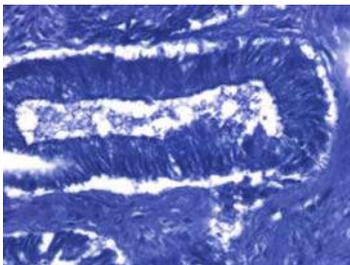
**Baffle**



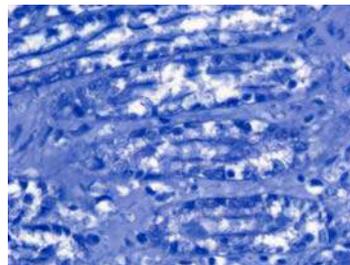
**Terminal**

# Microestrutura: análise

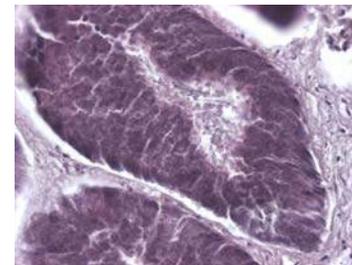
- Mas, entram em funcionamento em diferentes períodos:
  - **Club & Papillary:** funcionamento síncrono, com um máximo no estado de maturação Activo (início de formação da cápsula); podem observar-se secreções no interior dos túbulos glandulares até à formação da cápsula.
  - **Baffle:** máximo de actividade durante o estado Avançado (cápsula em formação)
  - **Terminal:** funcionamento no último estado de maturação, Extrusão.



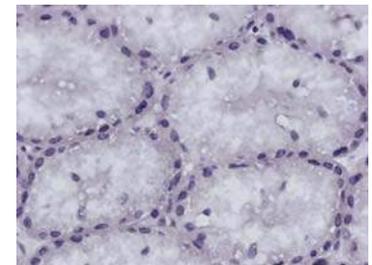
**Club**



**Papillary**



**Baffle**

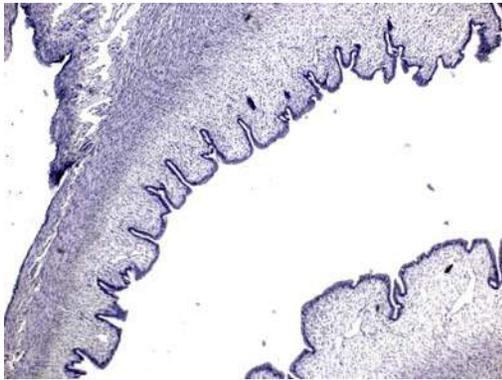


**Terminal**

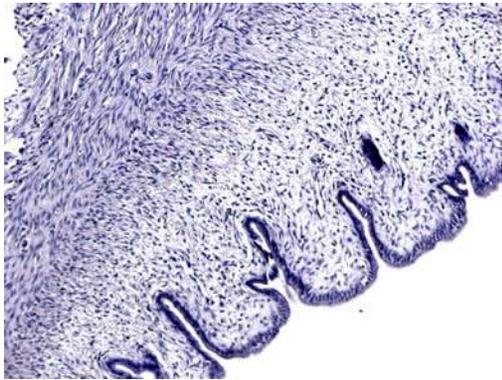
- Nas zonas *baffle* e *terminal* observou-se esperma ao longo de toda a secção transversal da glândula oviducal

# Útero: análise preliminar

## Em maturação

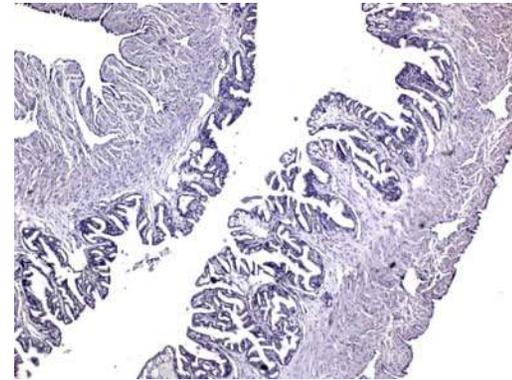


RJC. H&E. 40x

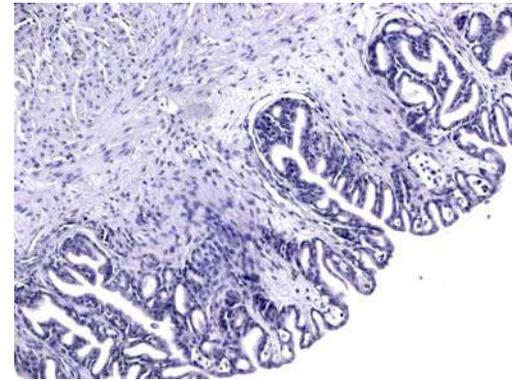


RJC. H&E. 100x

## Maturo



RJN. H&E. 40x



RJN. H&E. 100x



# MACHOS



# Sistema Reprodutivo - Machos

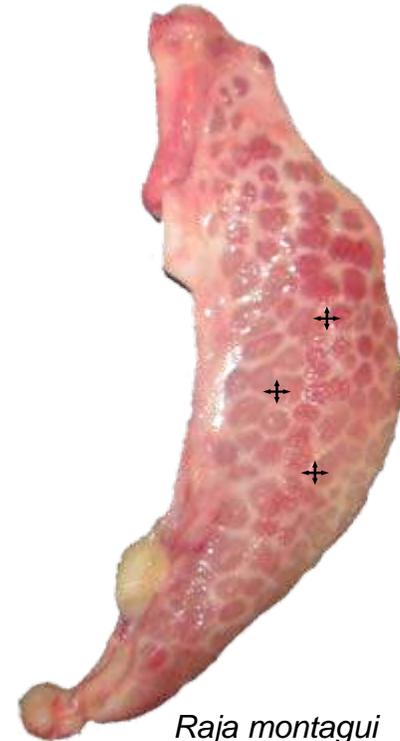
## Claspers/Pterigopódios



*Leucoraja naevus*

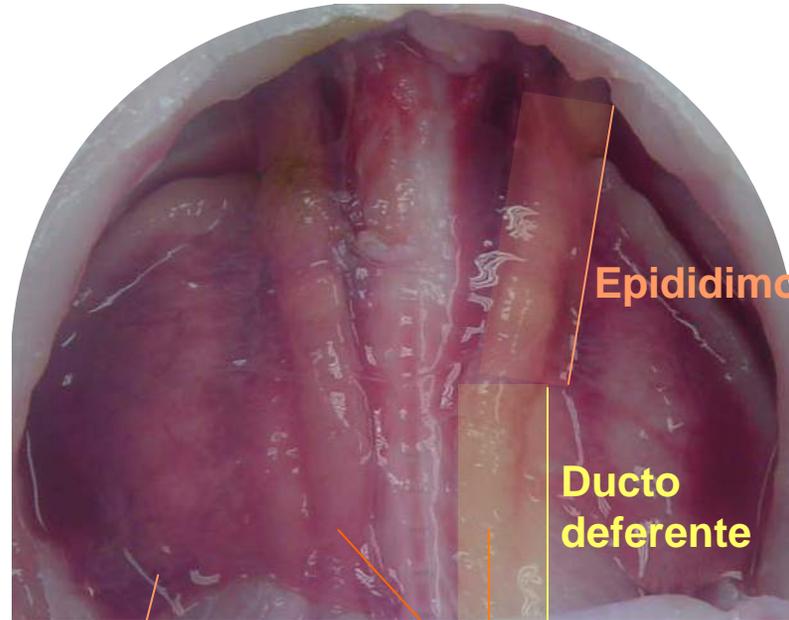
- Órgão copulador
- Elaborado sistema de cartilagens

## Testículo



*Raja montagui*

# Sistema Reprodutivo - Machos



**Testículo**

**Ductos espermáticos**

- Histologia:
  1. Validação das escalas de maturação macroscópicas
  2. Caracterização de espermatocistos
  3. Identificação da presença de esperma

- Histologia:
  1. Validação das escalas de maturação macroscópicas
  2. Identificação da presença de esperma

# Escala de maturação - Machos

1. Imaturo

2. Em  
maturação

3. Maduro

4. Activo

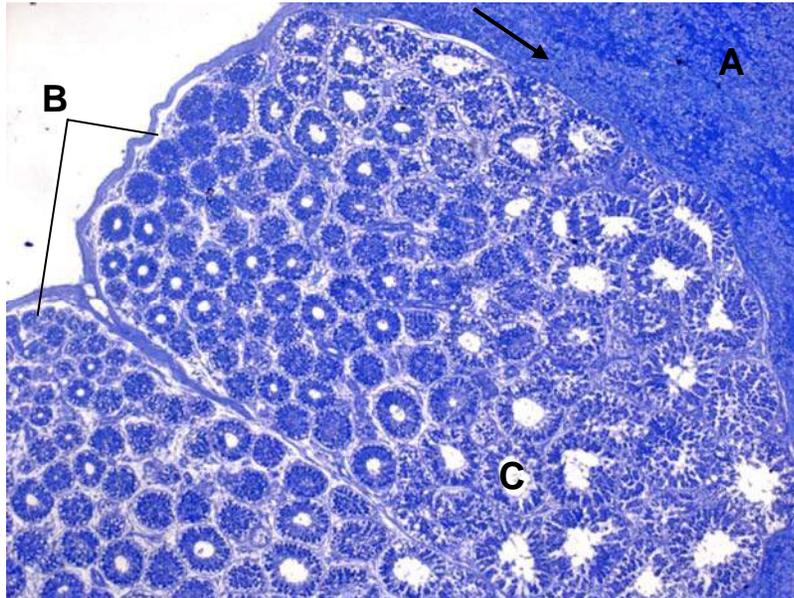
Externo



Interno

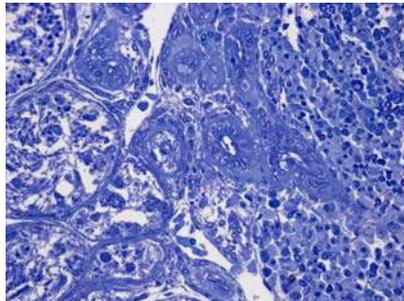


# Testículo: organização

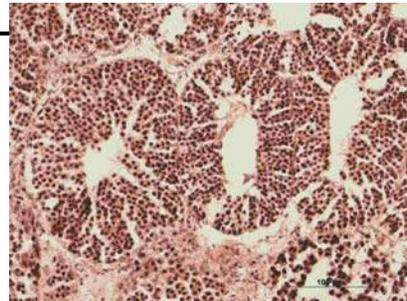


RJM. AT. 40x

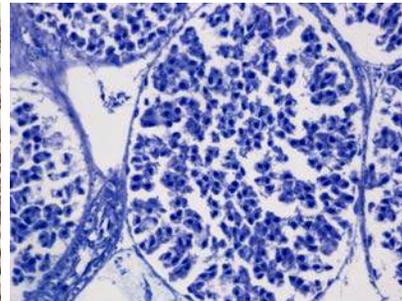
- A. Orgão epigonal
- B. Zonas germinativas
- C. Folículo seminífero/Espematocisto



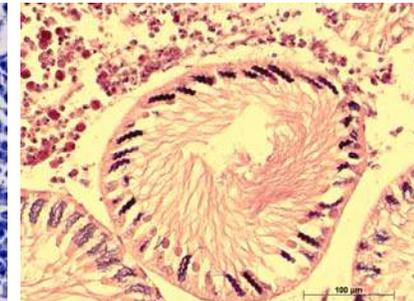
RJM. AT. 200x



RJC. H&E. 200x



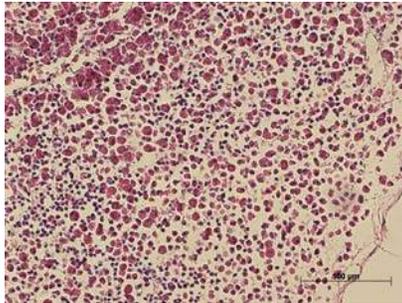
RJC. AT. 200x



RJC. H&E. 200x

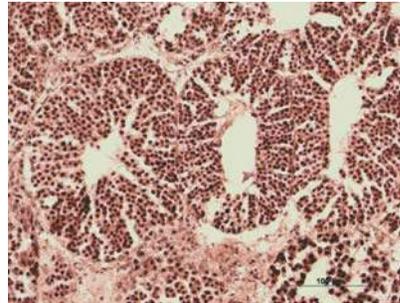
# Testículo: espermatogénesis

## Espermatogónias



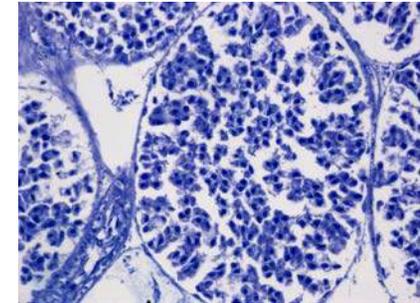
RJC. H&E. 200x

## Espermatócito estado II



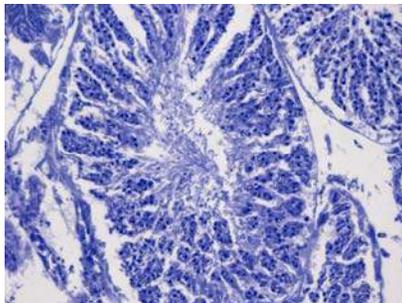
RJC. H&E. 200x

## Espermatócito estado III



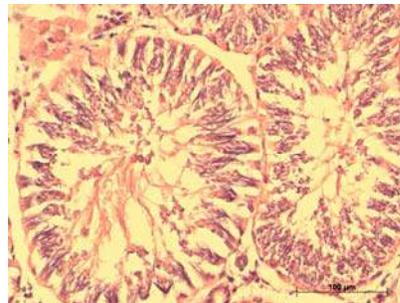
RJC. AT. 200x

## Espermatócito estado IV



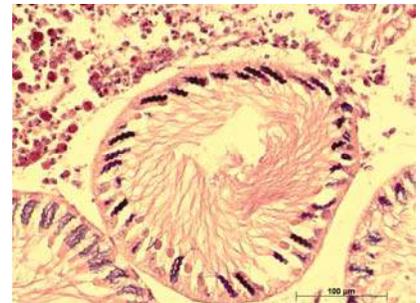
RJC. AT. 200x

## Espermatócito estado V



RJM. H&E. 200x

## Espermatócito estado VI

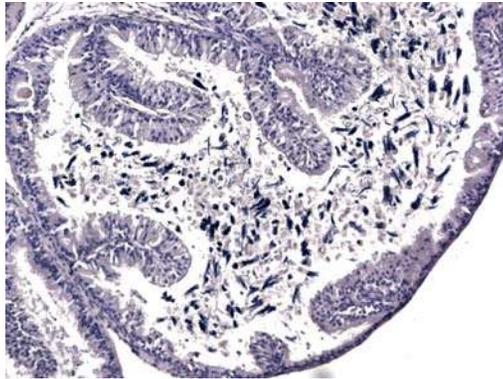


RJC. H&E. 200x

# Epididimo: análise preliminar

## Corte longitudinal

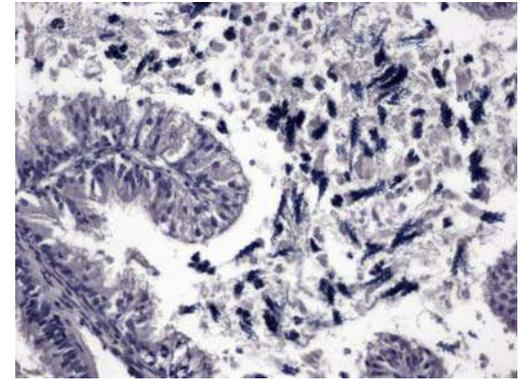
**Maturo**



RJC. H&E. 40x

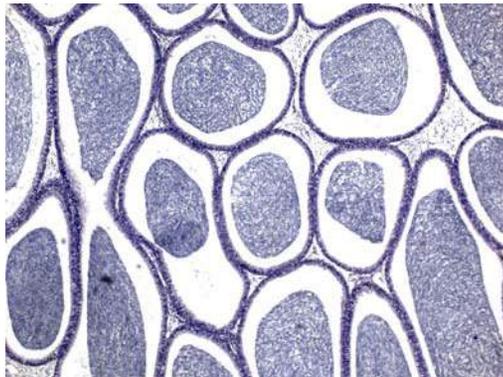


RJC. H&E. 100x

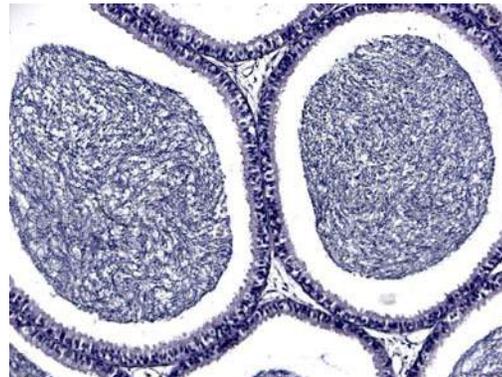


RJC. H&E. 200x

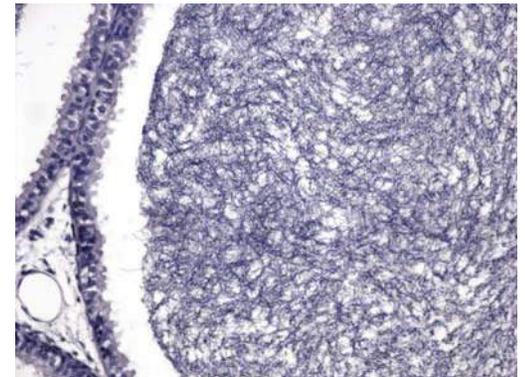
## Corte transversal



RJC. H&E. 40x



RJC. H&E. 100x

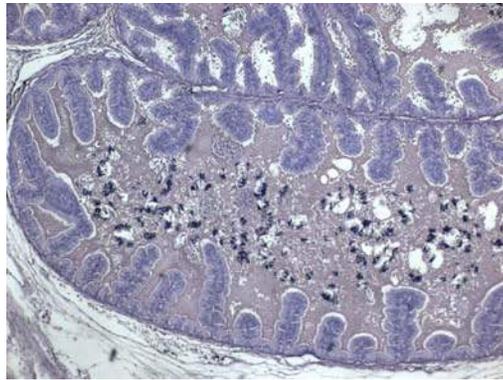


RJC. H&E. 200x

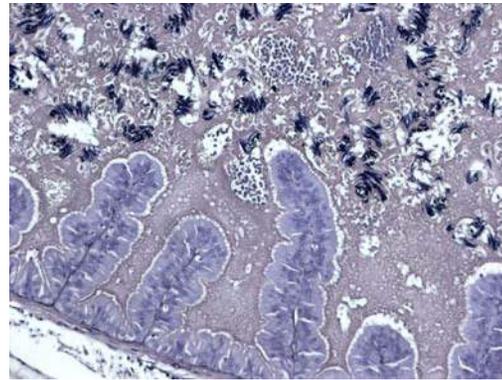
# Ducto deferente: análise preliminar

## Corte longitudinal

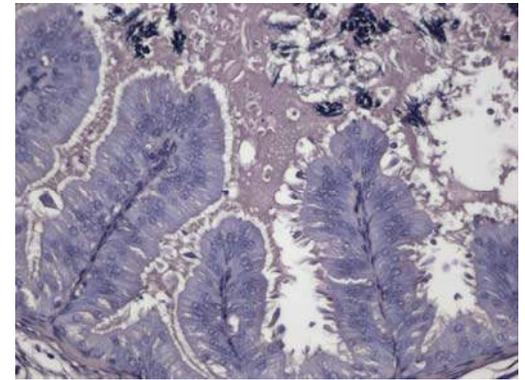
**Maturo**



RJC. H&E. 40x

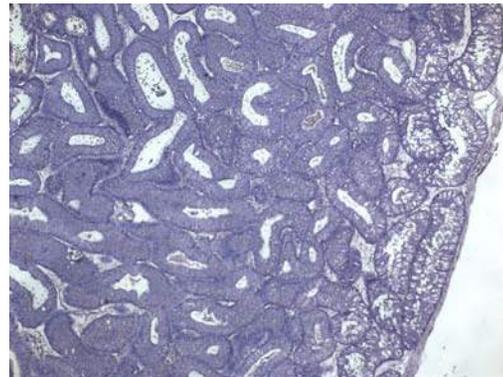


RJC. H&E. 100x

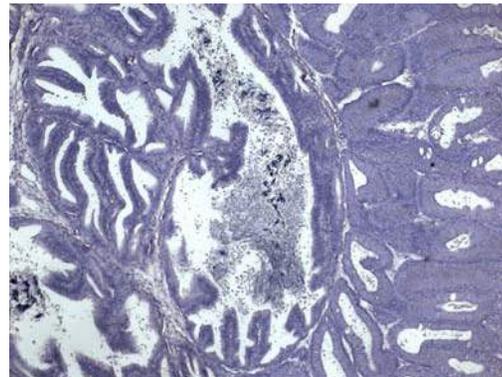


RJC. H&E. 200x

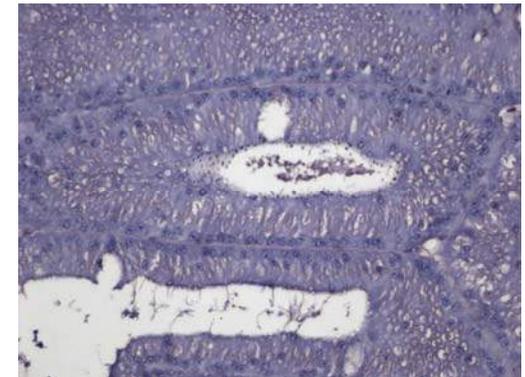
## Corte transversal



RJC. H&E. 40x



RJC. H&E. 40x



RJC. H&E. 200x

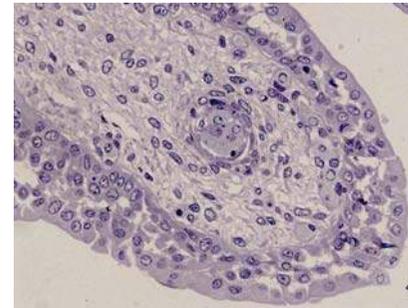
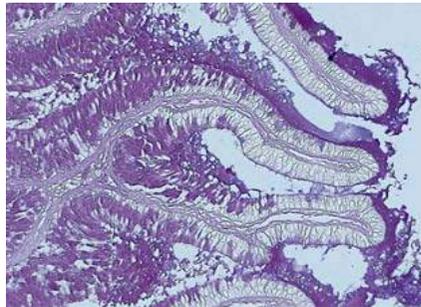
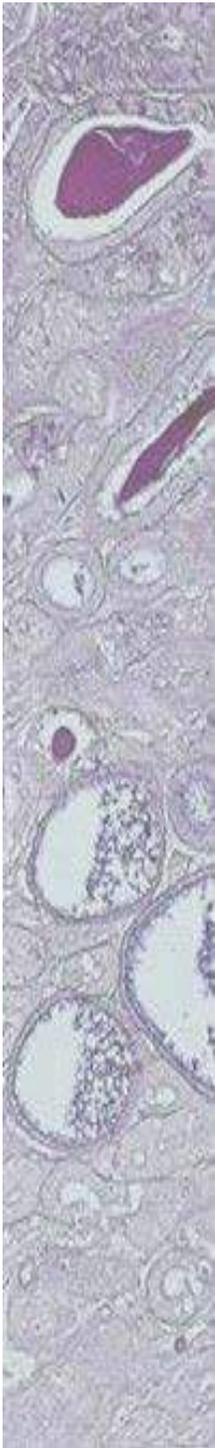


**Obrigada!**

## **ANEXO 2 – XII**

“Aplicação da histologia ao estudo da biologia reprodutiva de tubarões de profundidade” – Moura, T., Figueiredo, I., Neves, A. e Gordo, L., 2006

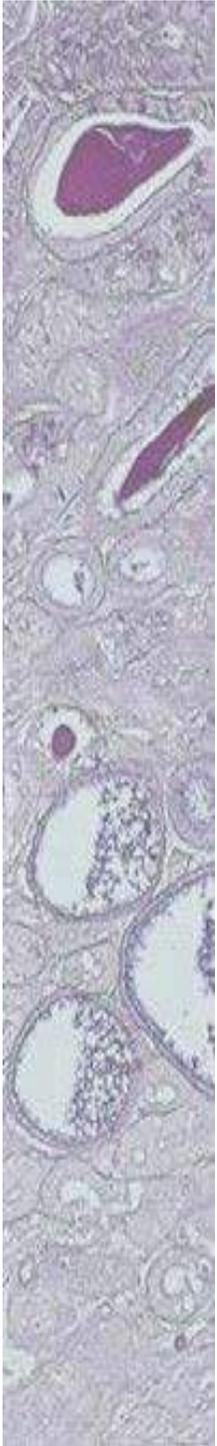
# Aplicação da histologia ao estudo da biologia reprodutiva de tubarões de profundidade



Workshop de Histologia

Projectos TUBAPROF & PNAB

IPIMAR, 22 e 23 de Novembro de 2006



---

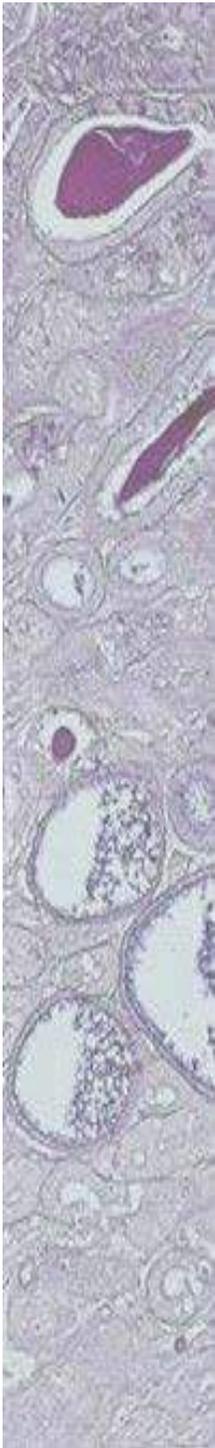
Sucesso evolutivo dos elasmobrânquios: existência desde à 400 milhões de anos



Eficiência da reprodução



- Modos de reprodução: ovíparos, vivíparos aplacentários, vivíparos placentários
- Fertilização interna: rentabilização da energia alocada à reprodução, maior probabilidade de sobrevivência
- Órgãos reprodutores especializados: pterigopódios, glândula oviducal e útero



---

**Nome científico**

*Centroscymnus coelolepis*

**Nome vulgar**

Carocho



**Distribuição**

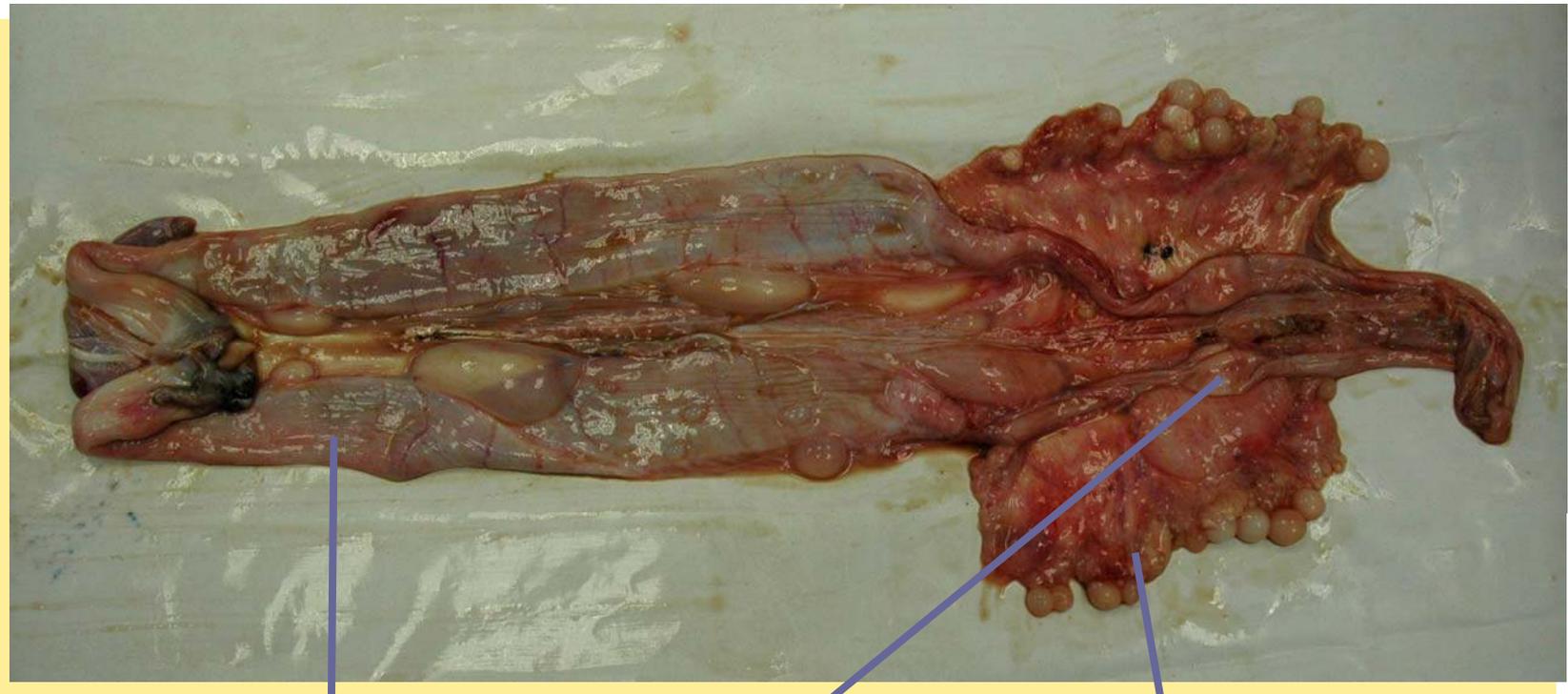
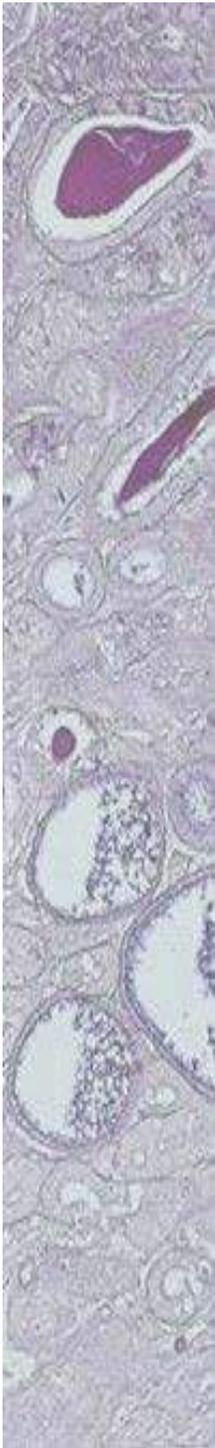
NE Atlântico, Gronelândia ao Senegal, África do Sul, Oceano Índico e Oceano Pacífico Oeste (Japão, Austrália e Nova Zelândia)

**Batimetria**

profundidades entre 130 – 3 700 m

---

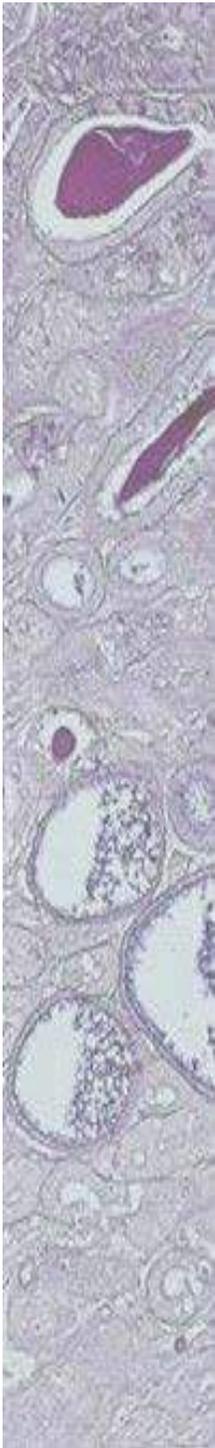
## Fêmeas - Aparelho reprodutor



Útero

Glândula Oviductal

Ovário



## Glândula oviducal

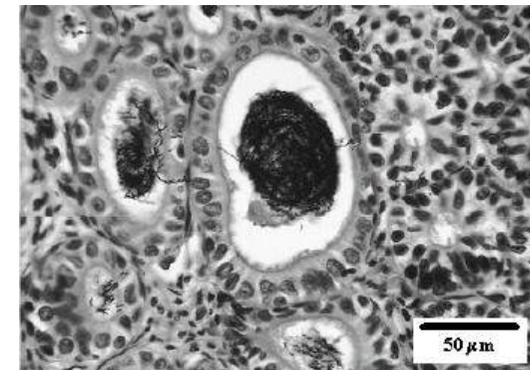
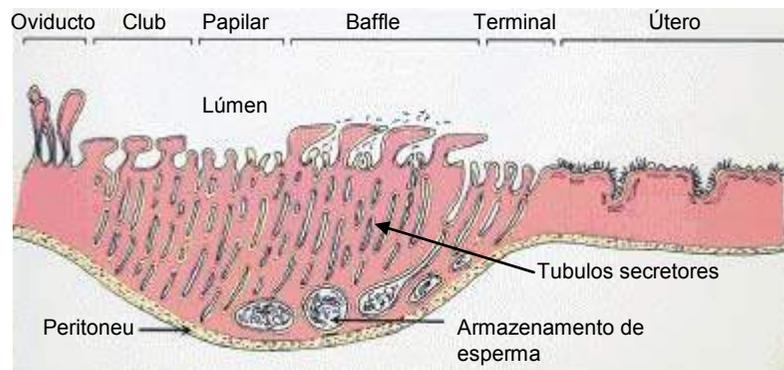
### Função

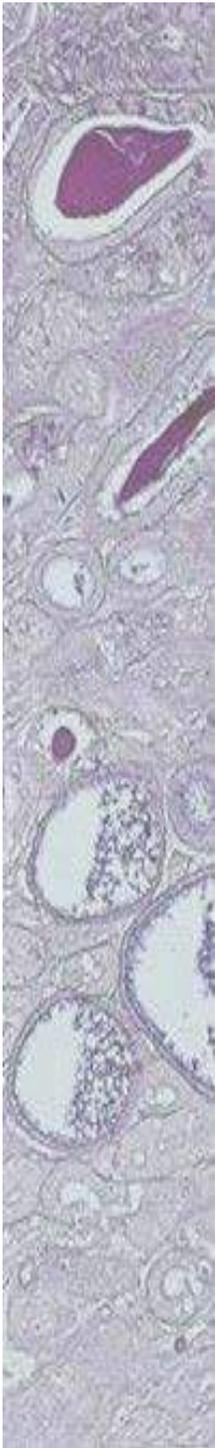
Formação da cápsula  
(regulação endócrina)

Armazenamento de esperma



Em geral identificam-se quatro zonas que segregam diferentes substâncias

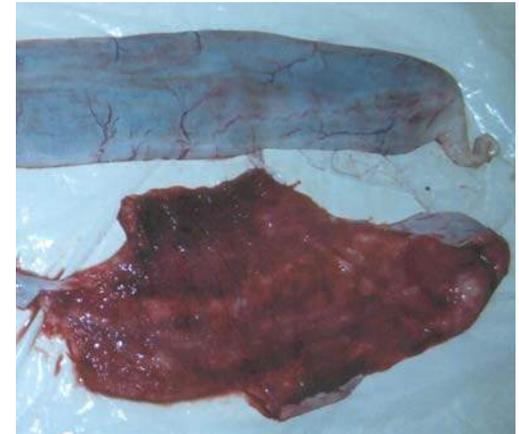




## Útero

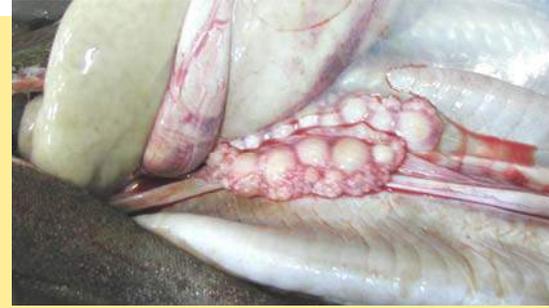
### Função

Acomodar o embrião  
Regulação do ambiente uterino  
Transferências embrião/mãe  
(oxigénio e excreções)



**Características** Vilosidades na parede interna  
Elevado grau de irrigação durante o desenvolvimento embrionário

## Estados de Maturação – Fêmeas – Estados ováricos



**Ovário** pequeno, granuloso a grande com oócitos vitelados

**Glândula** Diferenciação e alargamento

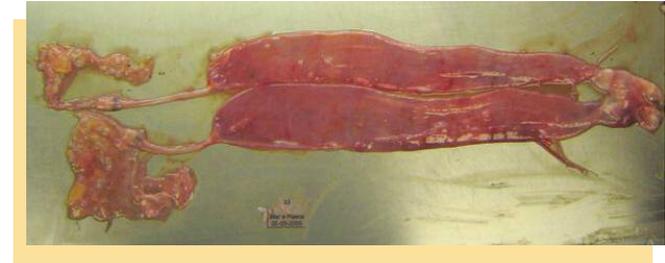
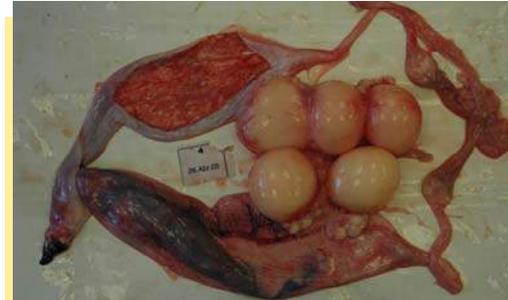
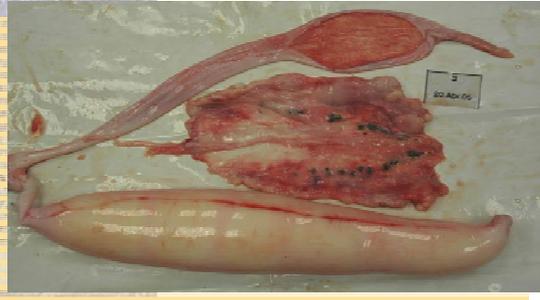
**Útero** Alargamento

**Estado 1**  
Juvenil

**Estado 2**  
Em maturação

**Estado 3**  
Matura

## Estados de Maturação – Fêmeas – Estados uterinos



**Ovário** Atrésias inicialmente de grandes dimensões

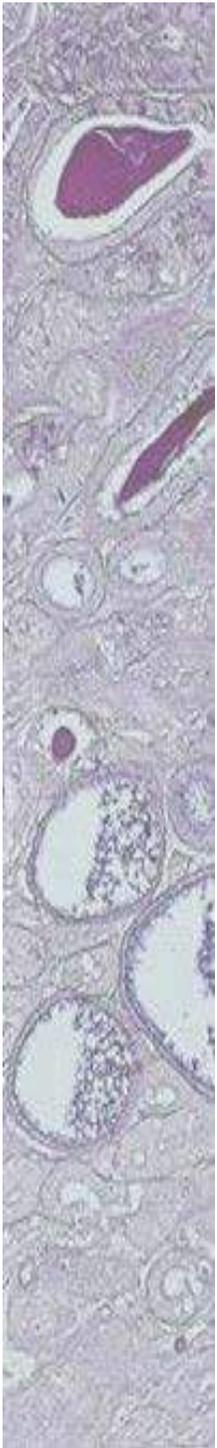
**Útero** Alargamento; Desenvolvimento desde ovos fecundados a embriões totalmente diferenciados

**Glândula** Diminuição de volume

**Estado 4**  
Em desenvolvimento

**Estado 5**  
Diferenciação

**Estado 7**  
Pós-parto



## Métodos

Recolha de porções da glândula oviductal e útero

Fixação em Formalina a 10% tamponada

Fixação em AFA

Inclusão em resina

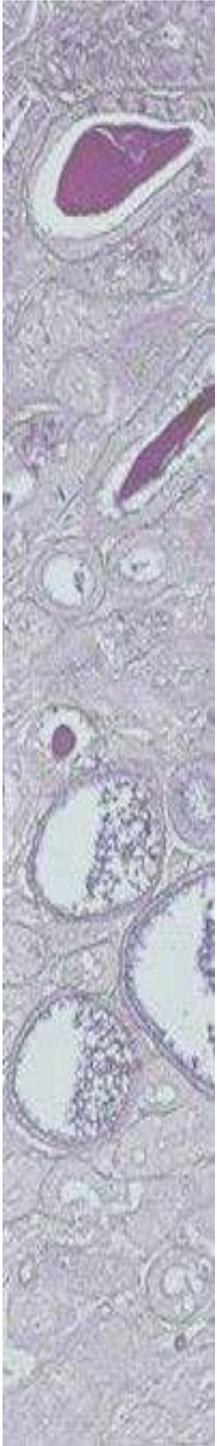
Inclusão em parafina

Cortes de 3  $\mu\text{m}$

Cortes de 5  $\mu\text{m}$

Coloração com Azul Toluidino

Coloração com PAS/Azul de Alcian



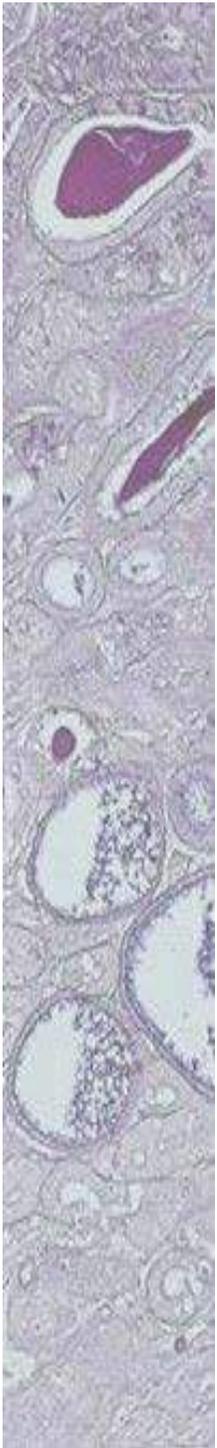
---

## Glândula oviductal



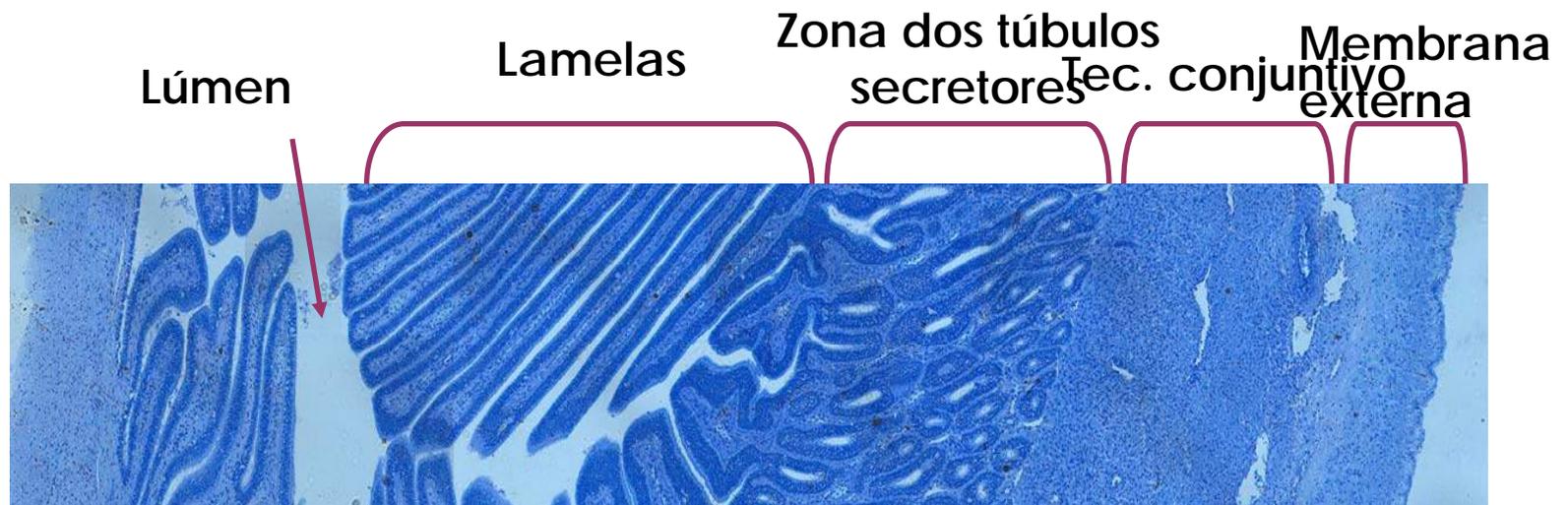
### Objectivos

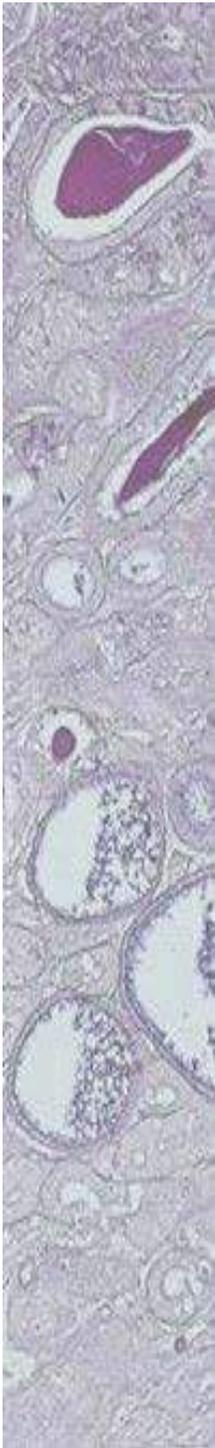
- Estudar a evolução e diferenciação das estruturas da glândula ao longo do ciclo reprodutivo



## Glândula oviductal

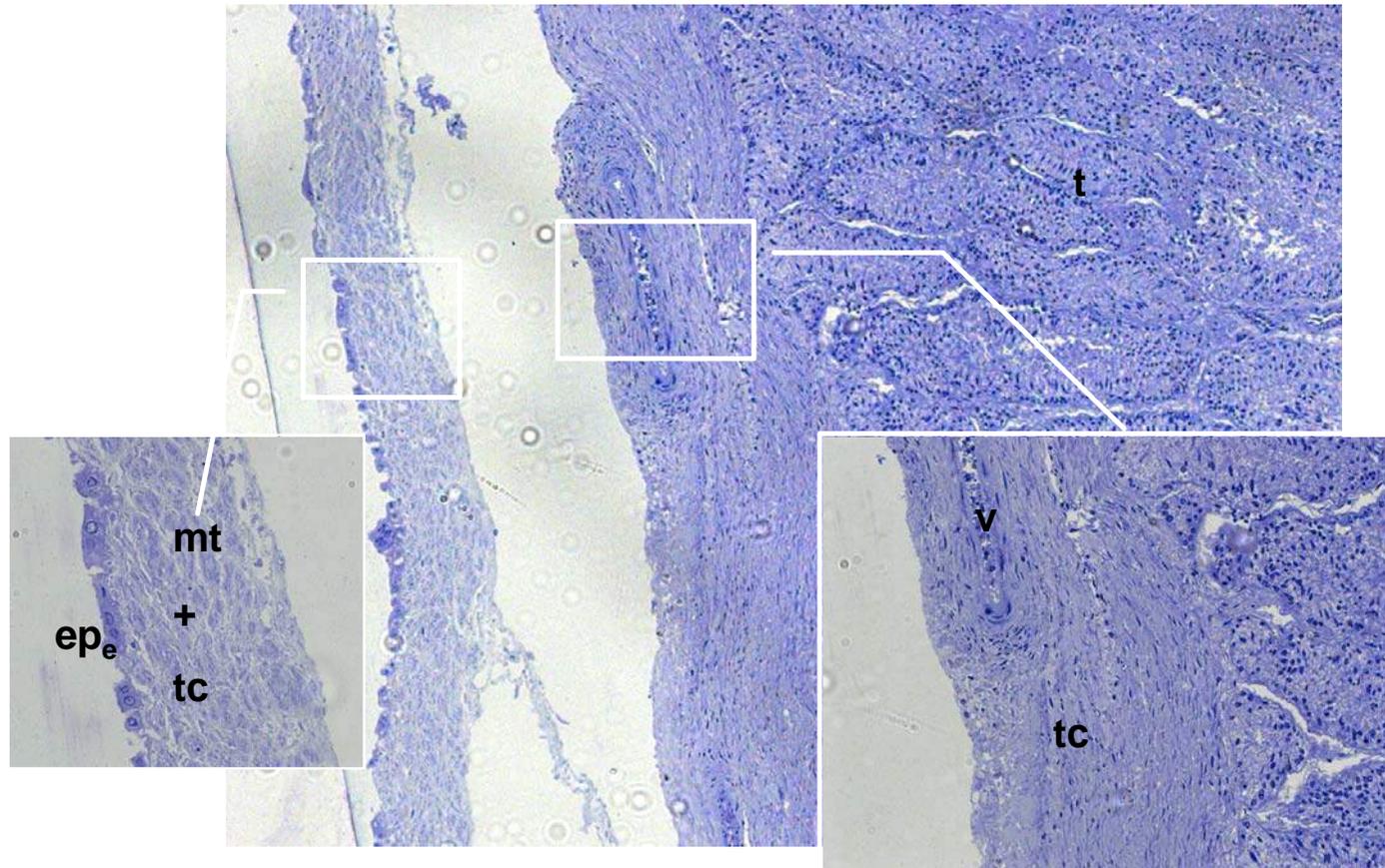
Esquema geral





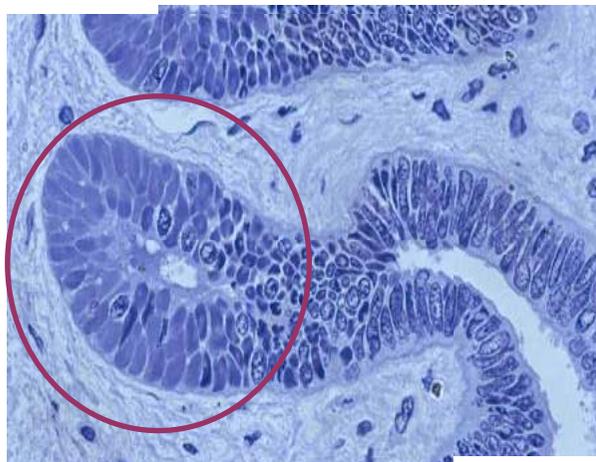
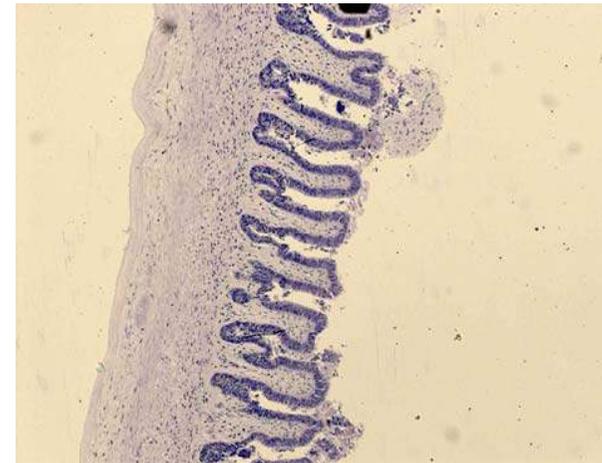
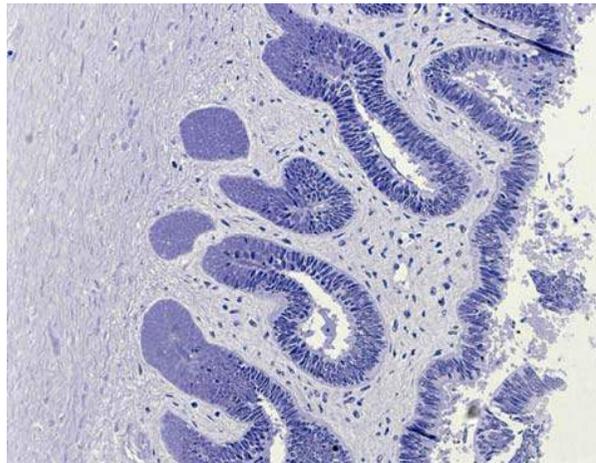
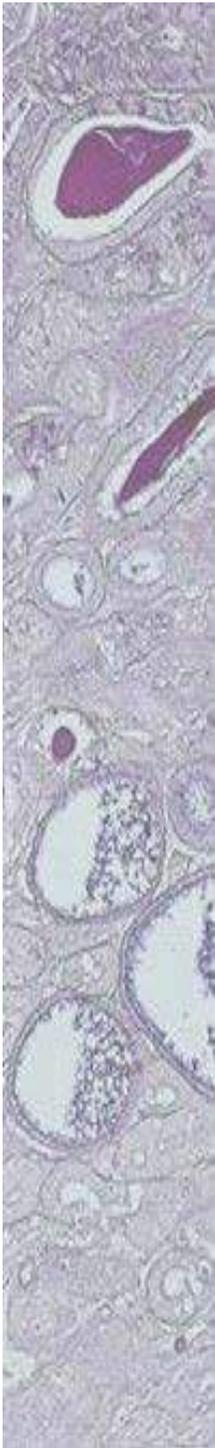
# Glândula oviductal

## Esquema geral

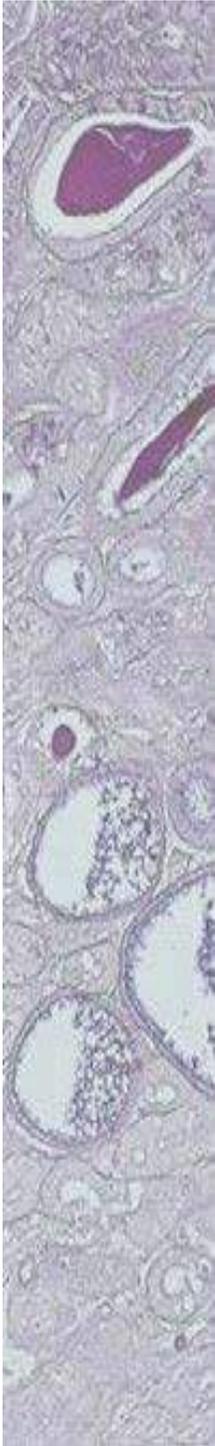


# Glândula oviductal

## Formação das lamelas



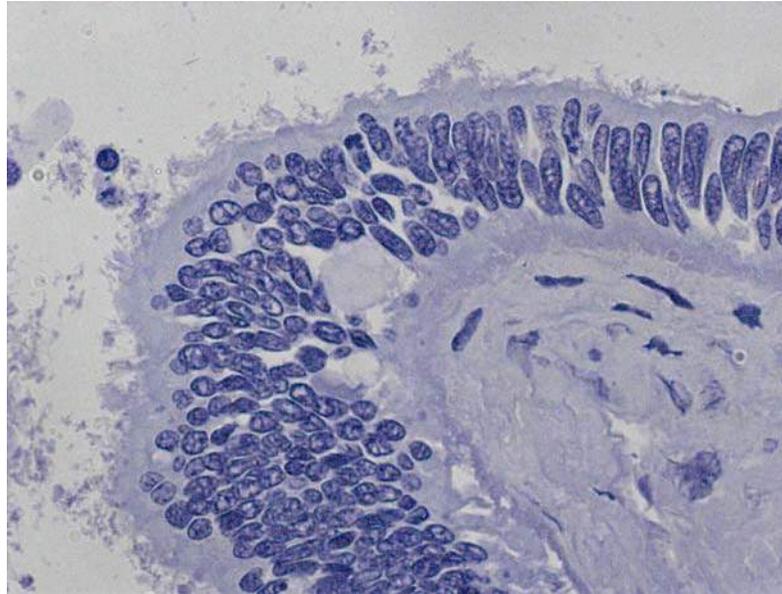
**Epitélio  
pseudoestratificado**



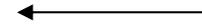
## Glândula oviductal



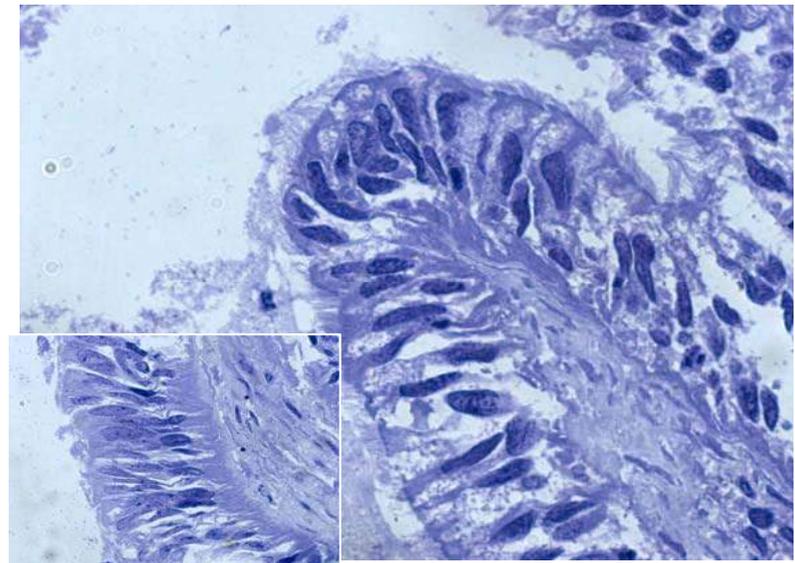
Epitélio das lamelas



Epitélio  
pseudoestratificado



Espaços  
intercelulares

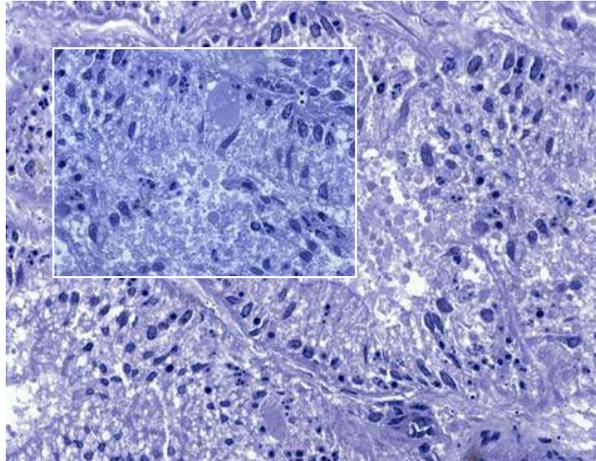




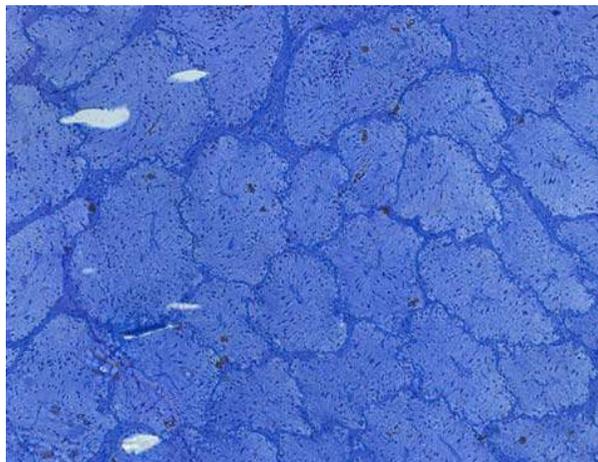
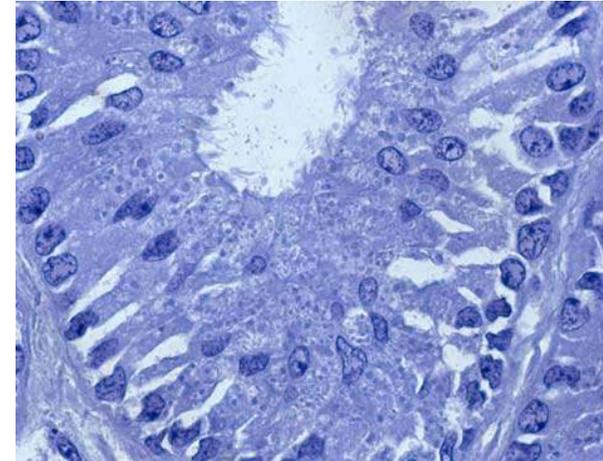
## Glândula oviductal

Túbulos secretores

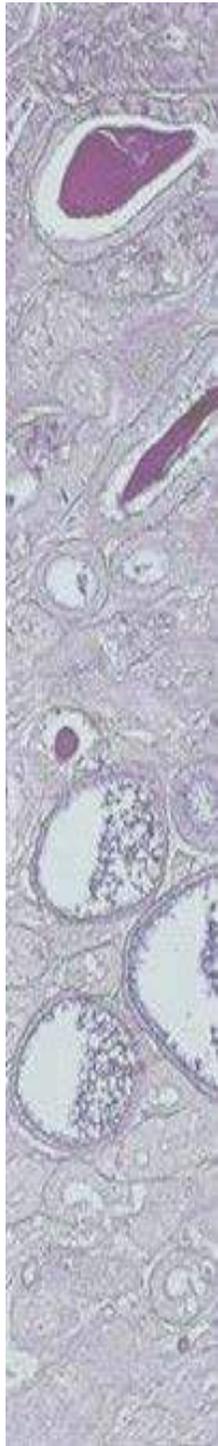
**Túbulo com lúmen repleto de secreções**



**Túbulo com lúmen vazio**



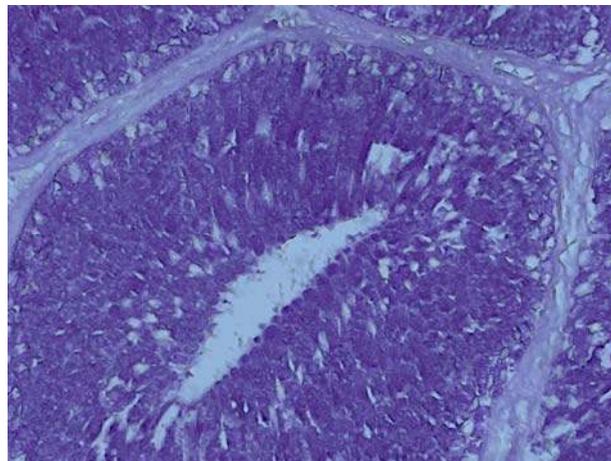
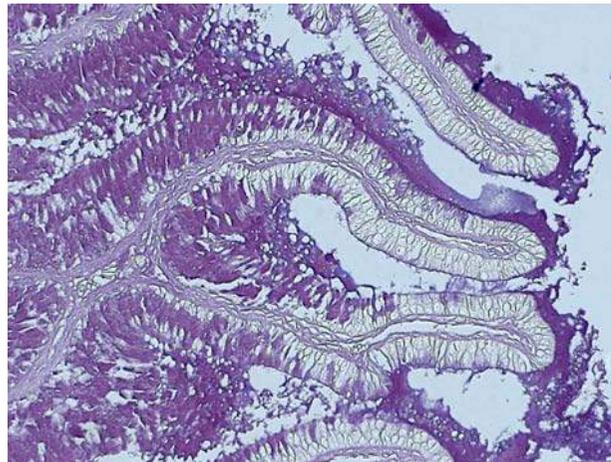
**Efeito devido à orientação do corte?**



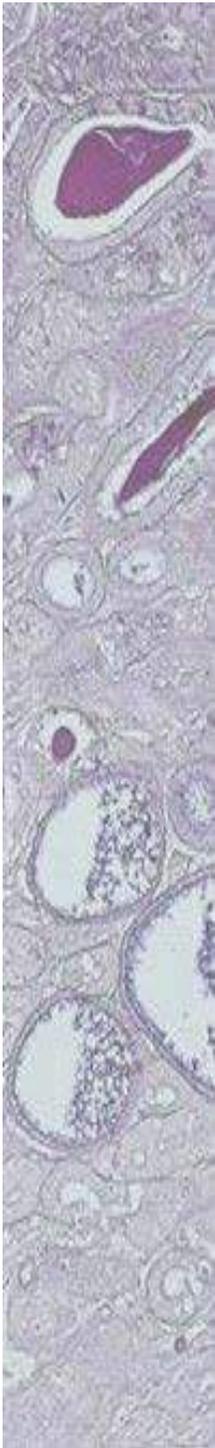
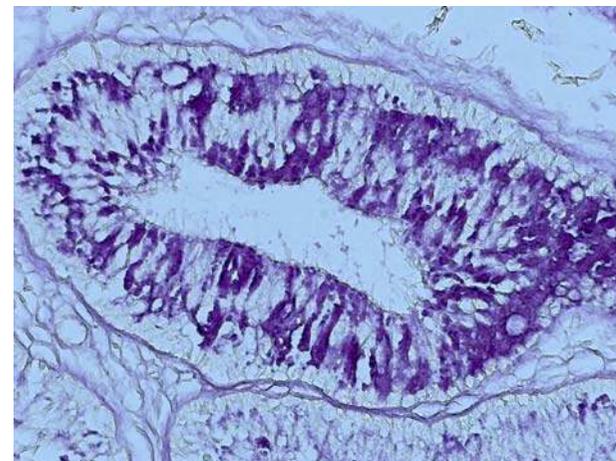
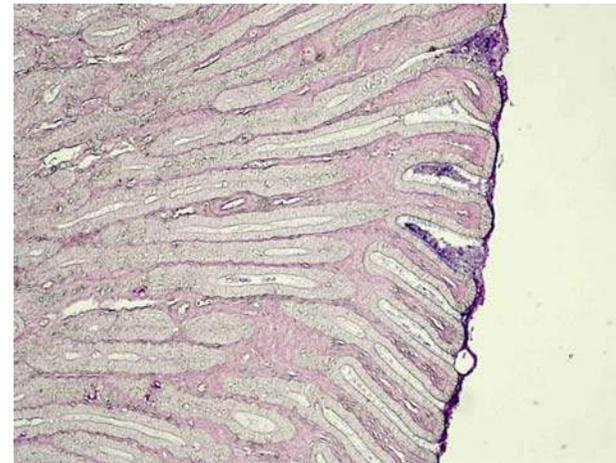
# Glândula oviductal

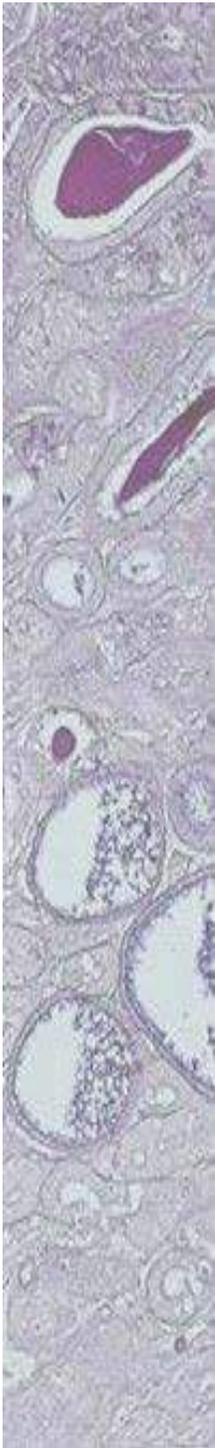
Coloração PAS

Fêmea madura



Fêmea em final de gestação





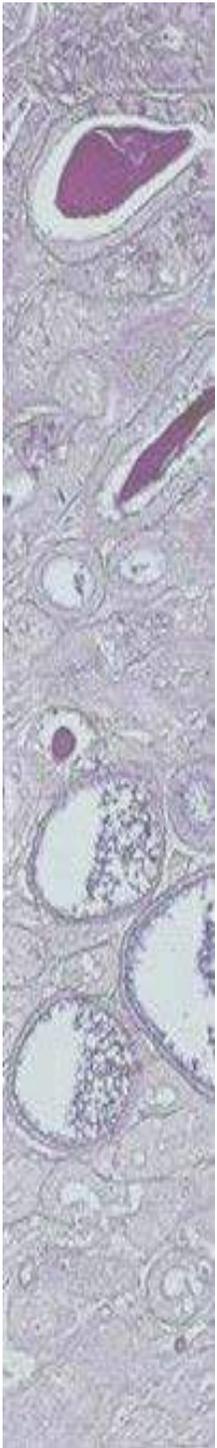
# Útero

---



## Objectivos

- Estudar as principais modificações histológicas ocorridas no útero ao longo do ciclo reprodutivo

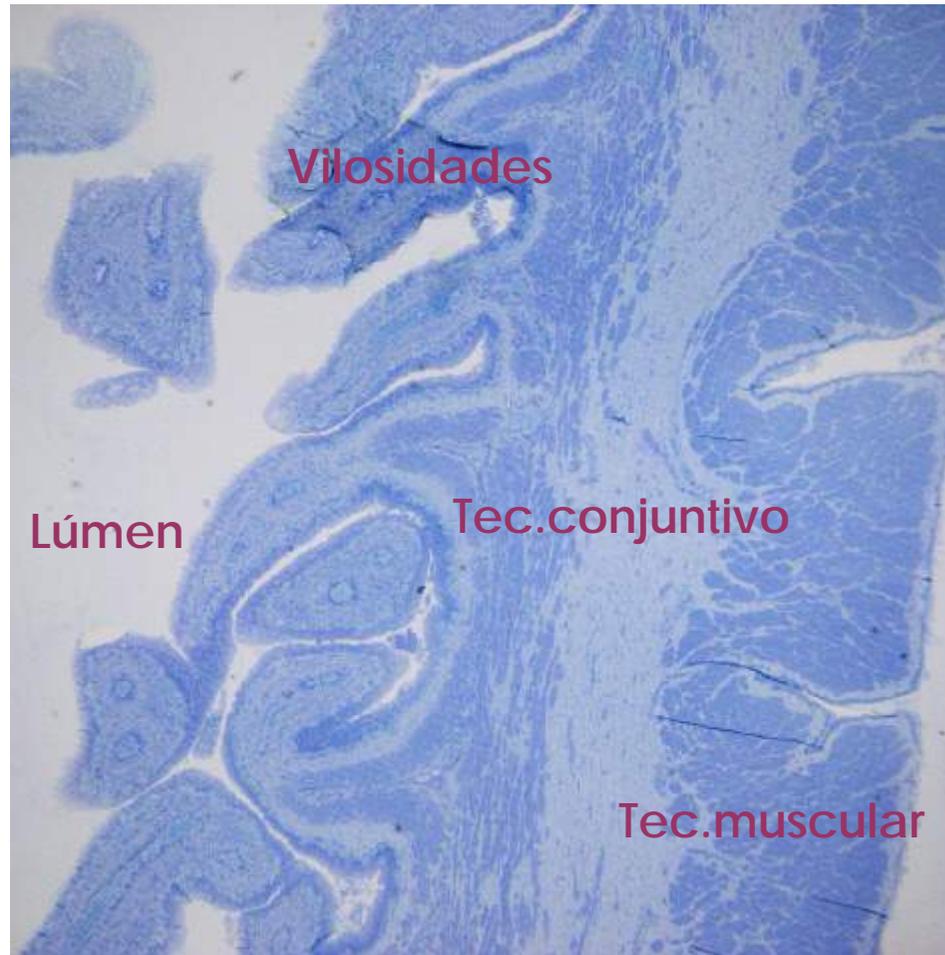


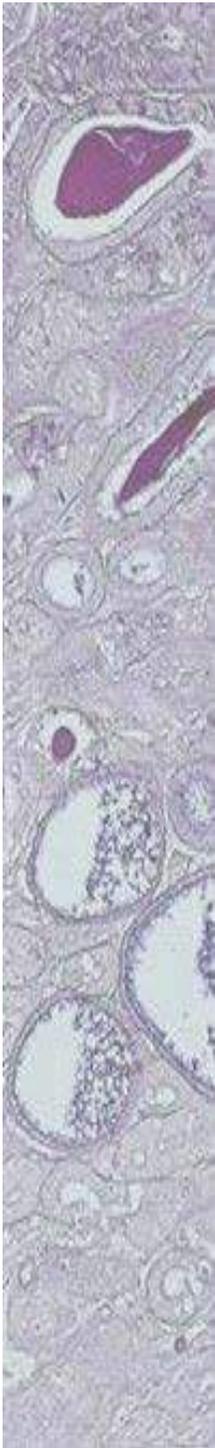
# Útero

---



## Esquema geral

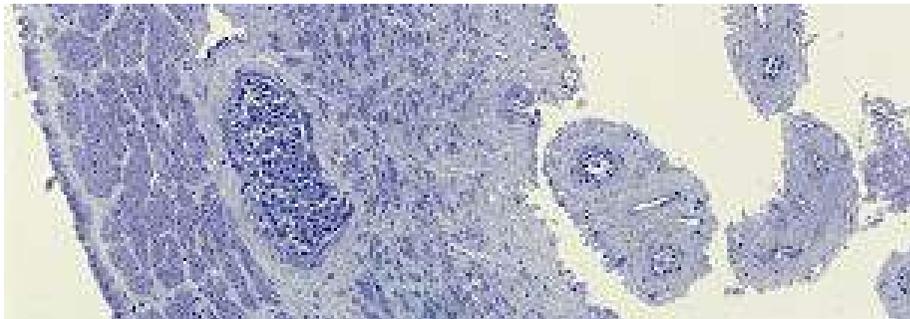
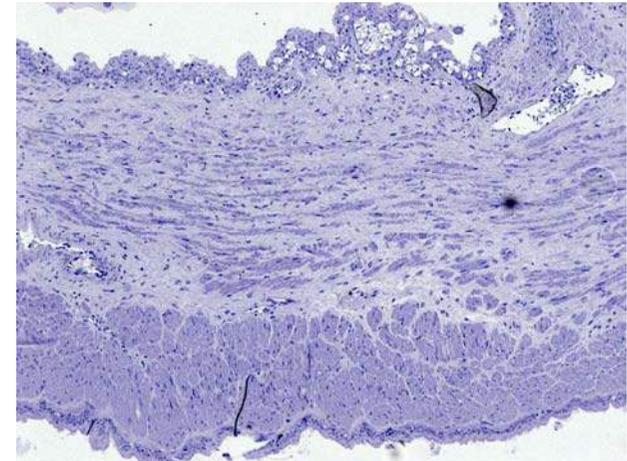
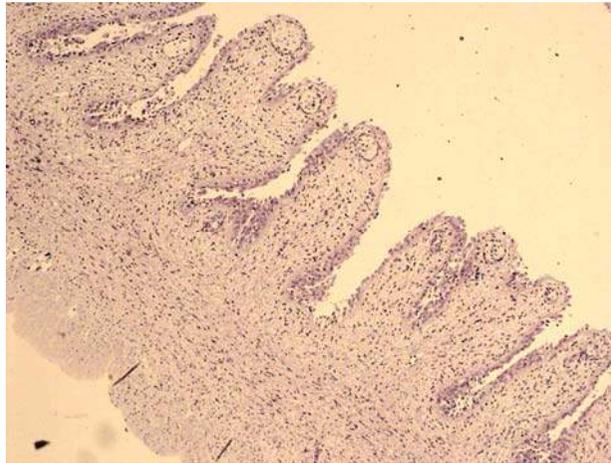




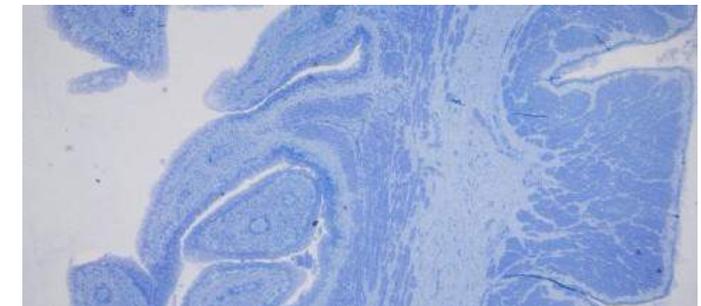
# Útero



## Principais modificações



Aumento do calibre dos vasos sanguíneos

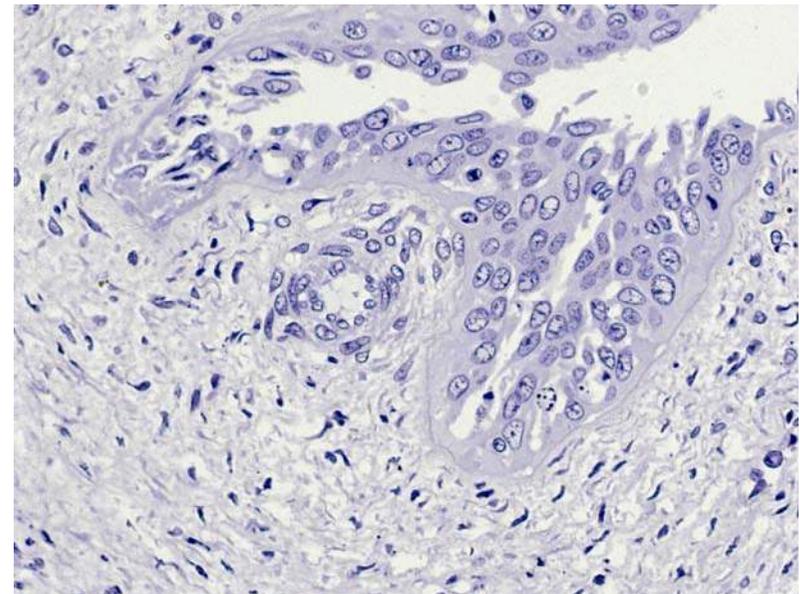
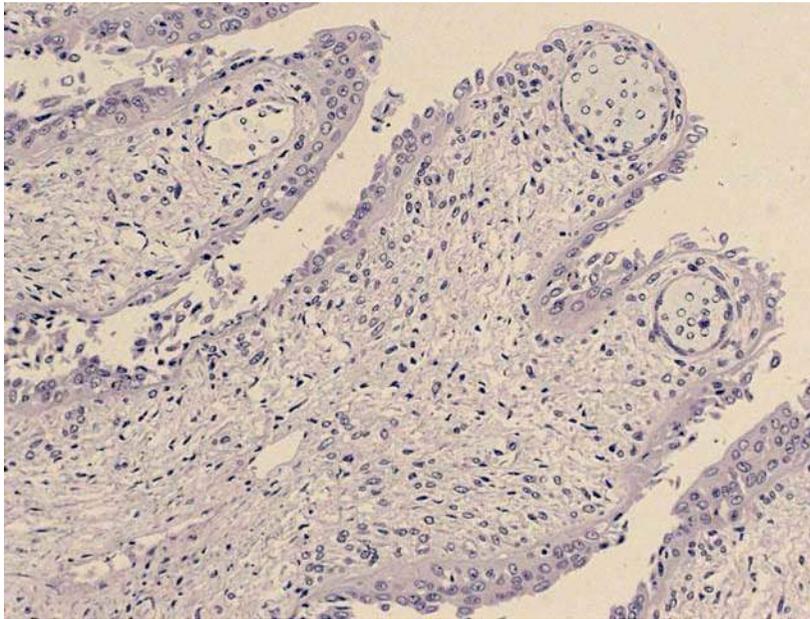
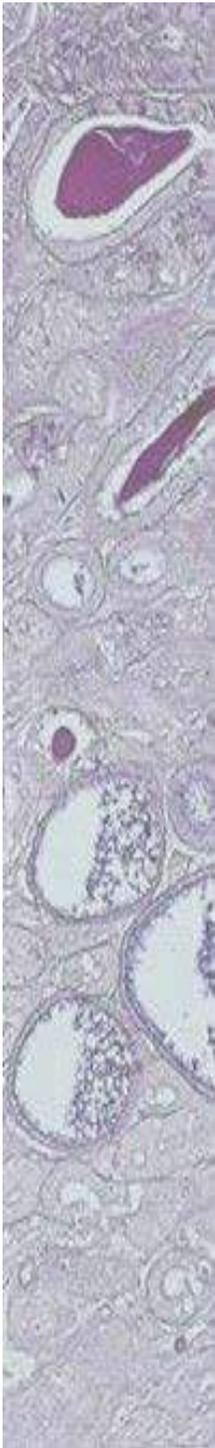


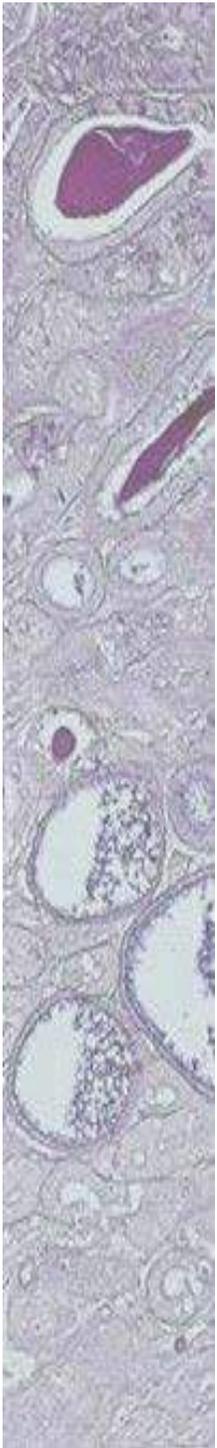
Reestruturação das vilosidades  
maior desenvolvimento da camada muscular

# Útero

---

## Formação das vilosidades internas

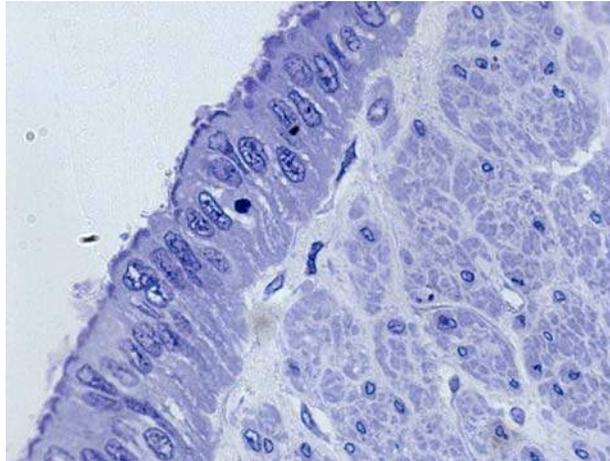




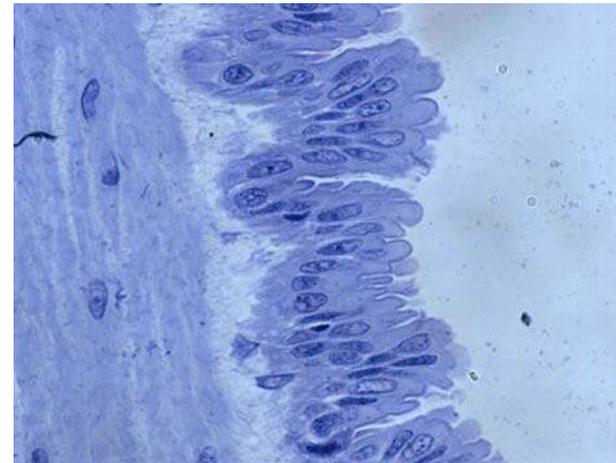
# Útero

## Variações no epitélio externo

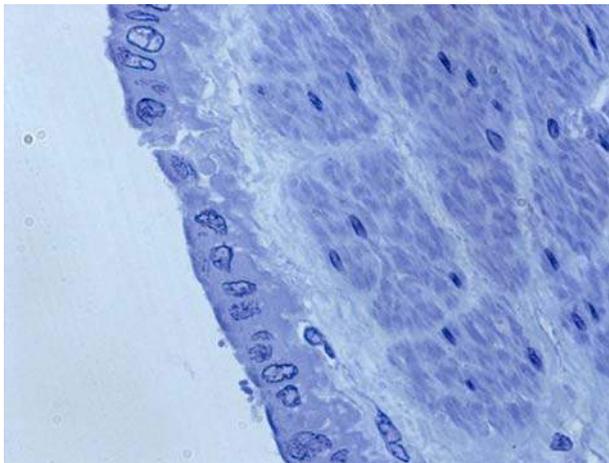
Fêmea madura



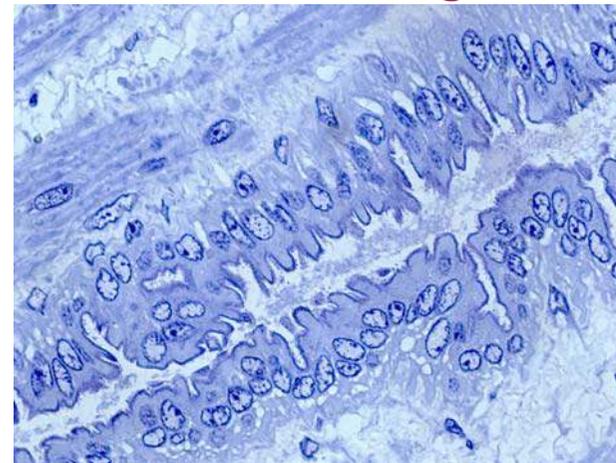
Fêmea em início de gestação

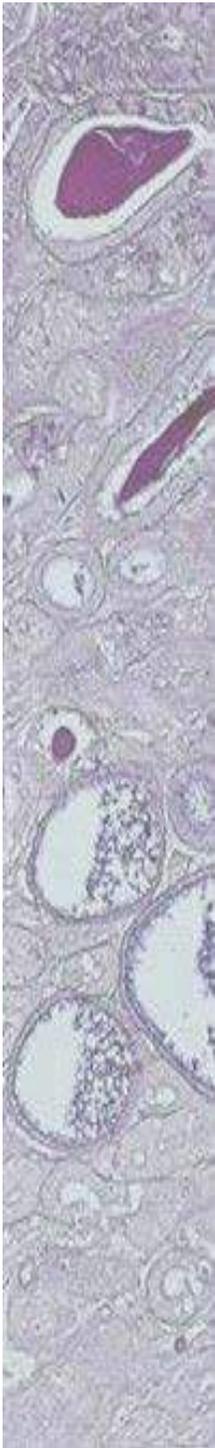


Fêmea em reinício de ciclo



Fêmea em final de gestação



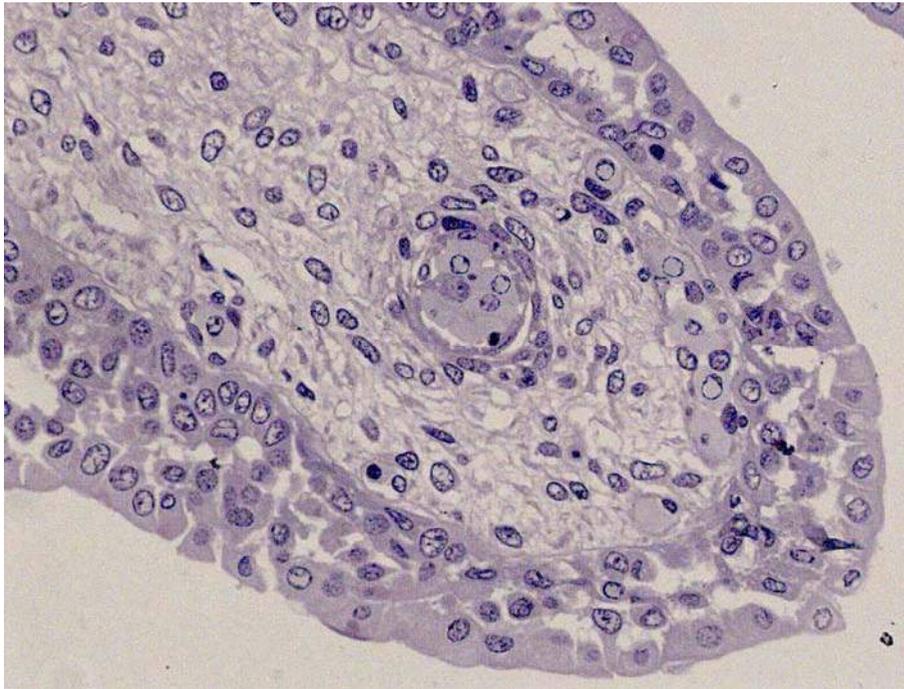


## Útero

---

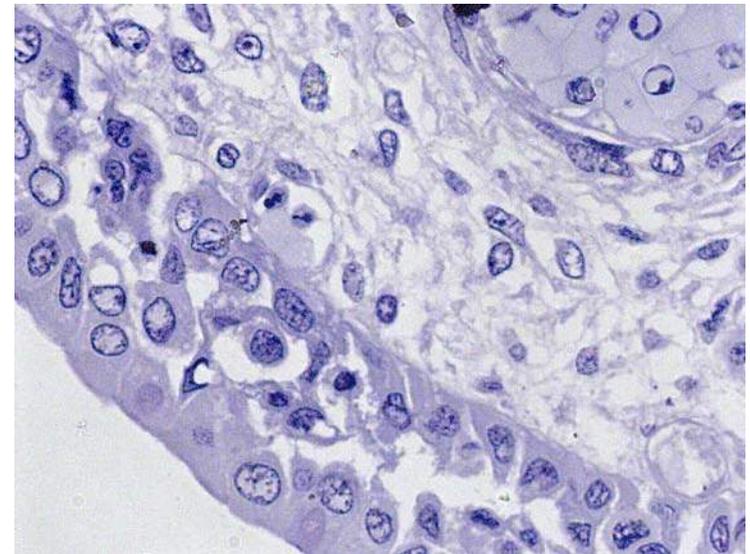


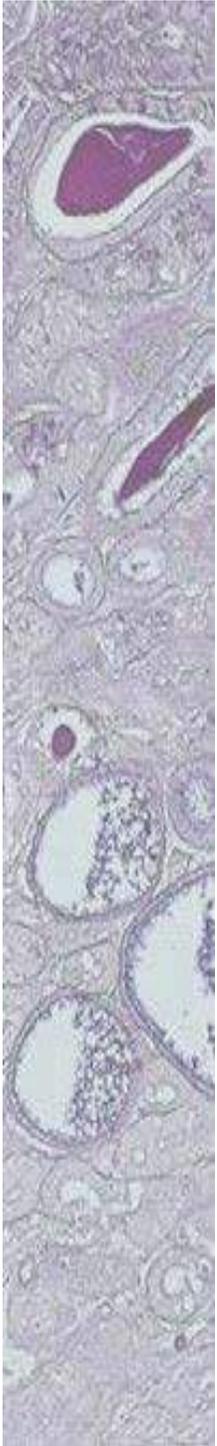
Variações no epitélio interno (vilosidades)



Fêmea em maturação

Organização do epitélio (epitélio pseudoestratificado)



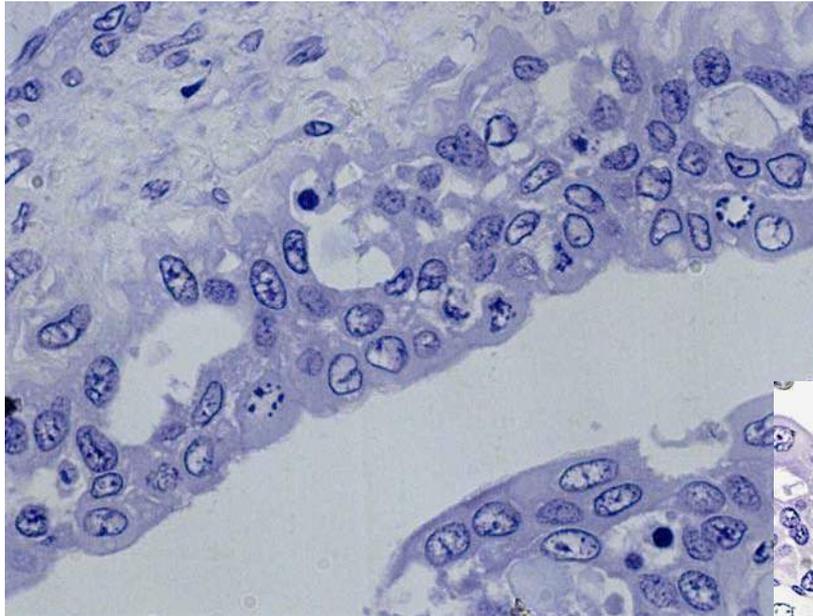


# Útero

---

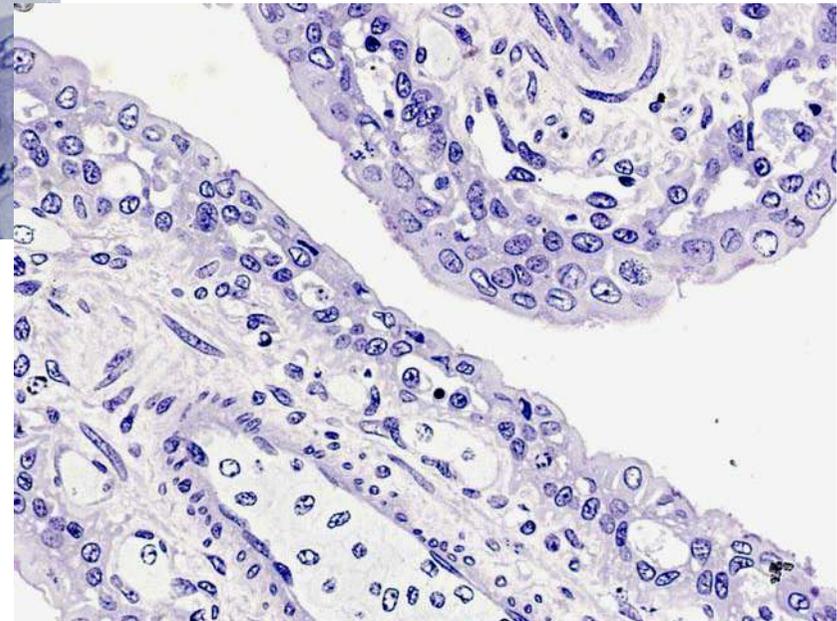


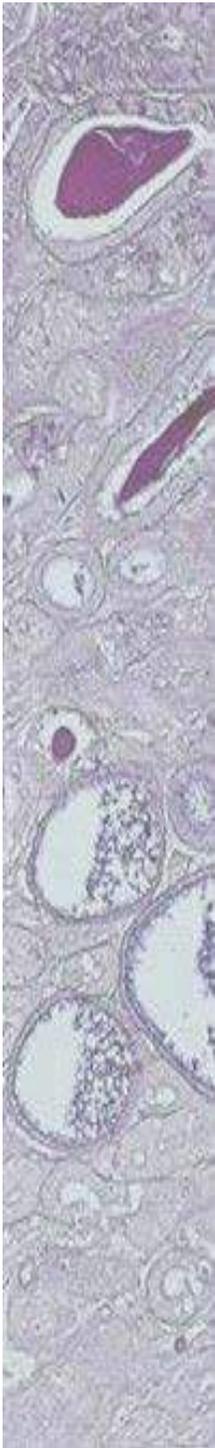
## Variações no epitélio das vilosidades



Fêmea madura

Actividade secretora



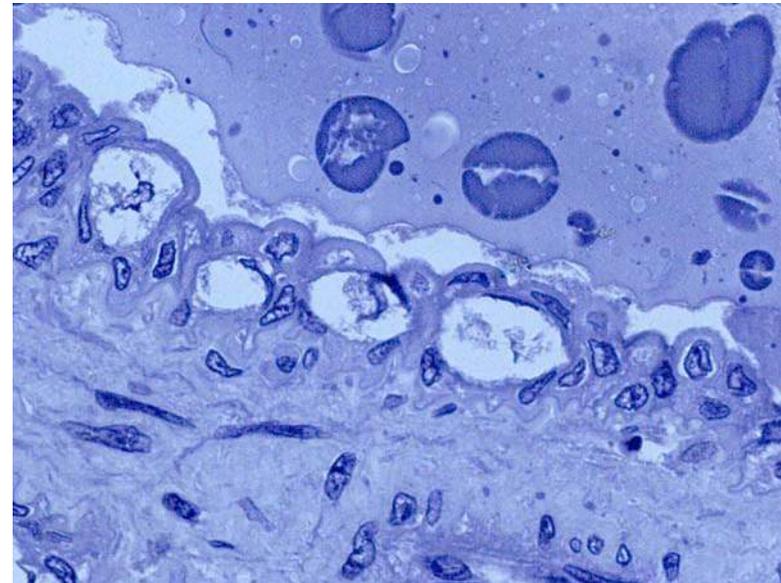
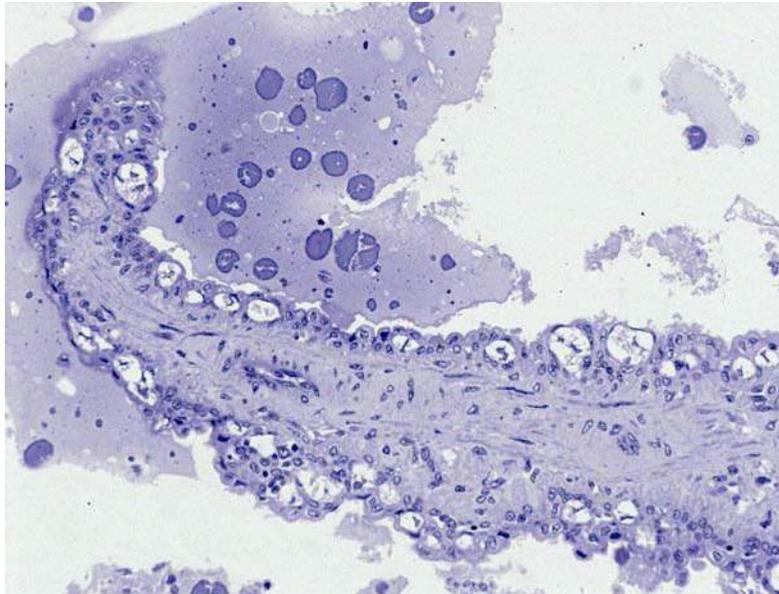


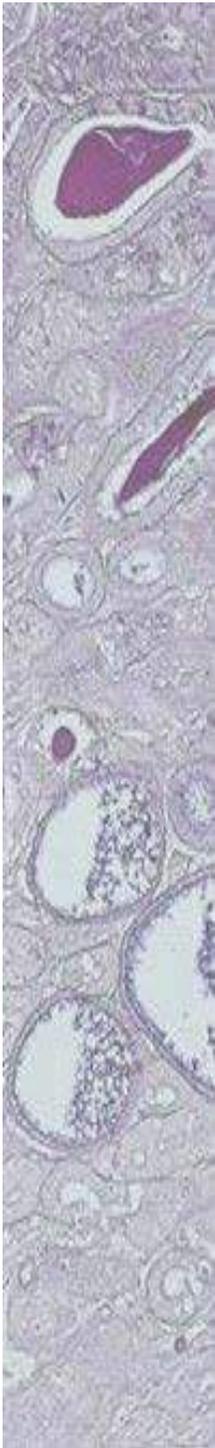
## Útero

---



### Variações no epitélio das vilosidades

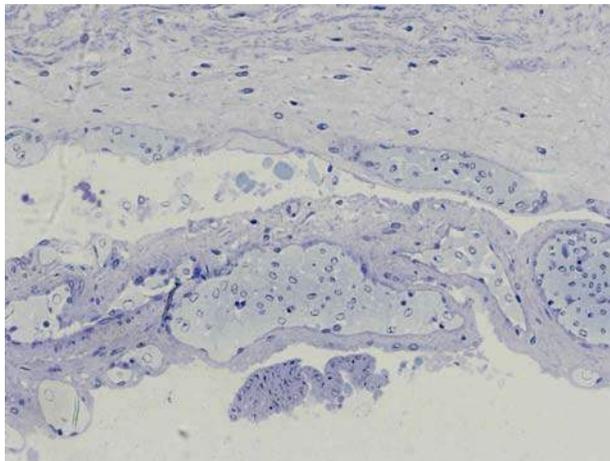
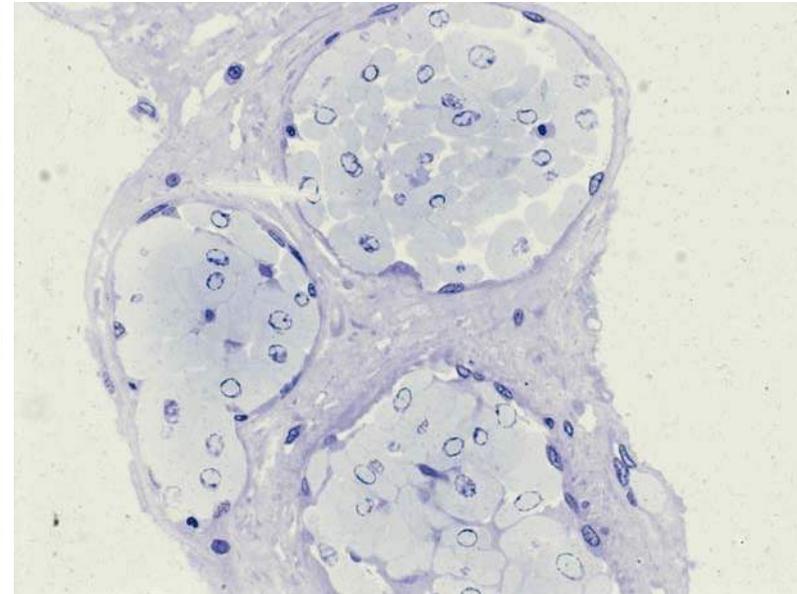
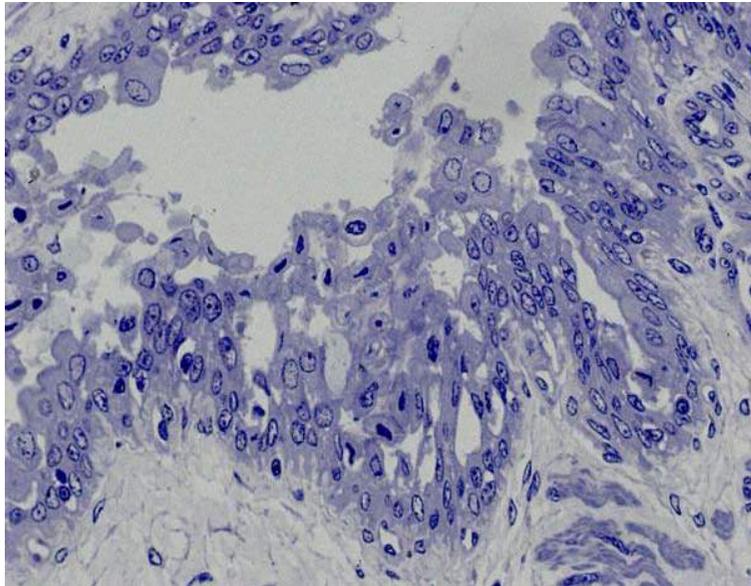




## Útero

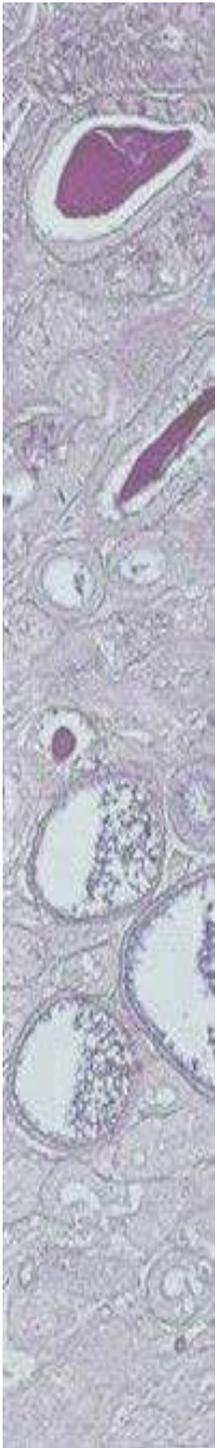


### Variações no epitélio das vilosidades



### Fêmea na fase final de gestação

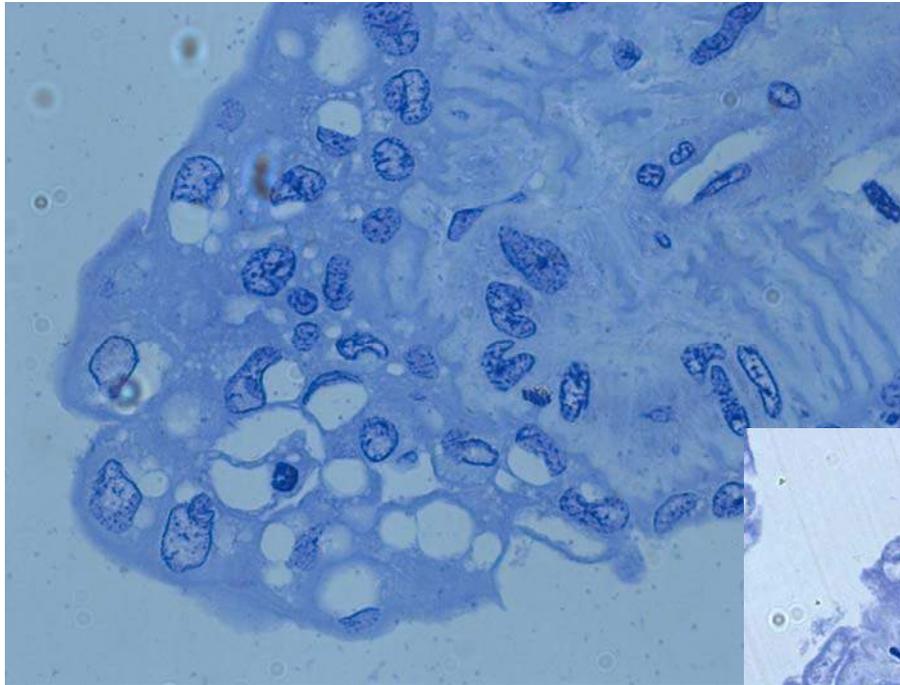
- Diminuição da espessura do epitélio
- Escamação
- Aumento do nº de vasos sanguíneos e seu calibre



## Útero



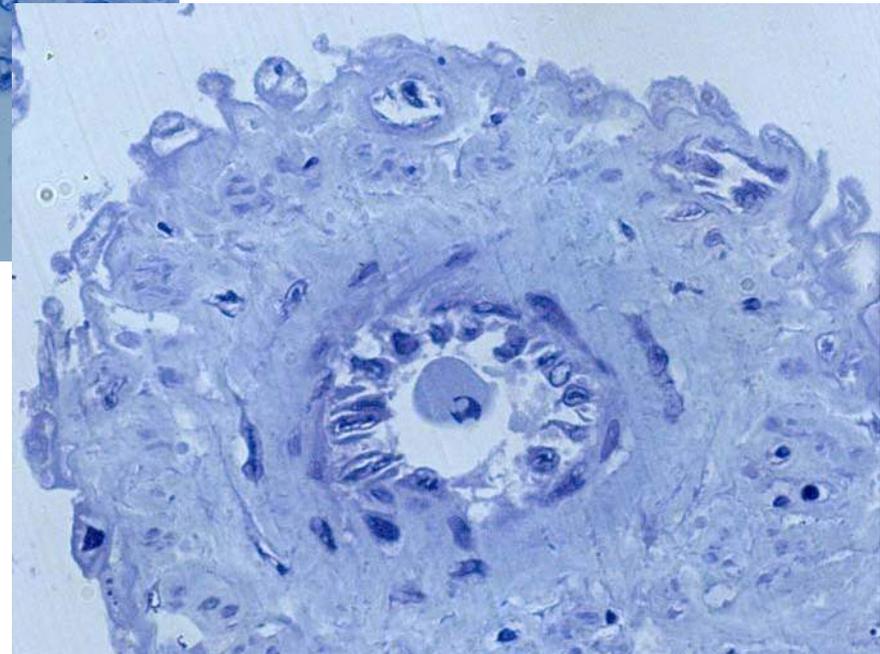
### Variações no epitélio das vilosidades

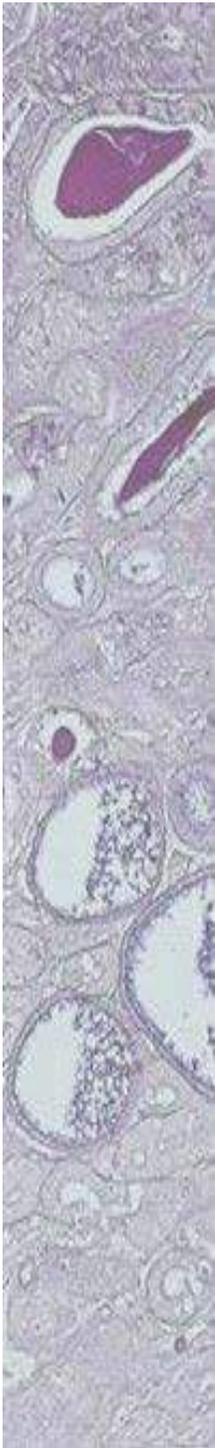


Fêmea pós-parturição

Epitélio pouco espesso e desorganizado

Vesículas vazias

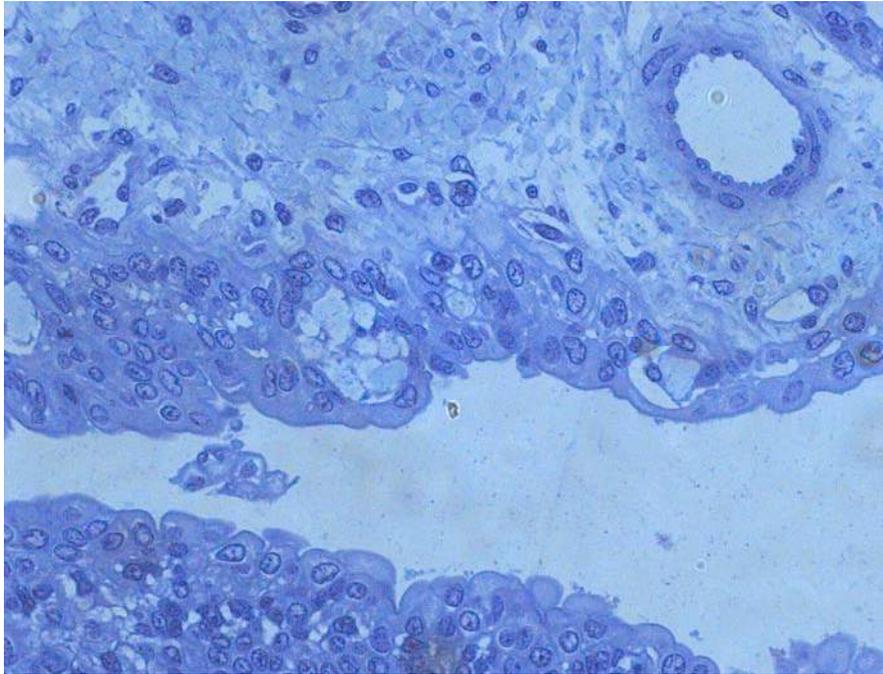




## Útero

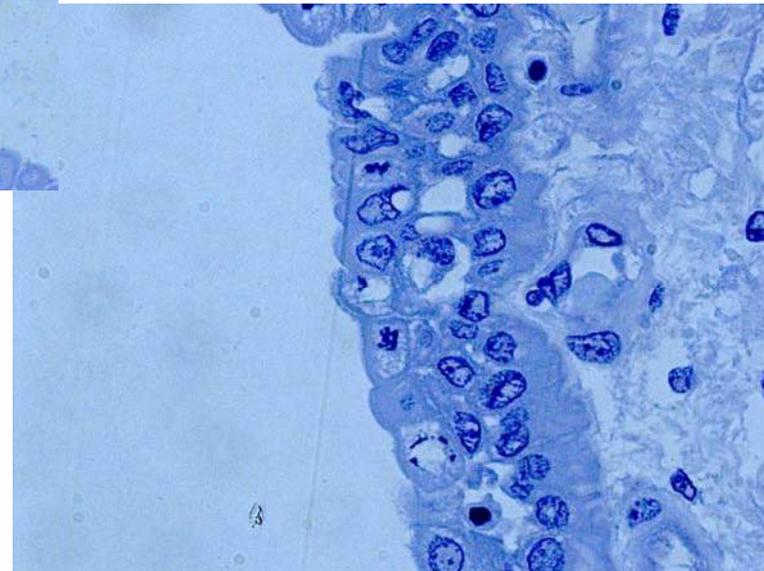


### Variações no epitélio das vilosidades



Fêmea em reinício de ciclo

Epitélio pseudoestratificado



**ANEXO 2 – XIII**

“HAKE – State of the ART” – Gonçalves, P., 2007

# HAKE – STATE of the ART

## Microscopic Maturity Stage Key

### *Microscopic characteristics*

<b>Maturity Stages</b>	<b>Females</b>	<b>Males</b>
Immature	Unyolked	Spermatogonia
Development	Cortical alveoli stage	Spermatocyte
Spawning	Migratory nucleus stage and hydrated oocytes	Spermatozooids
Post-spawning	Post-ovulatory follicles and atresia	Empty seminiferal ducts
Resting	Perinucleolar stage and atresia	Spermatocyte

All studies until now are focus on  
females microscopic maturity stages

# HAKE – STATE of the ART

## Microscopic Maturity Stage Key

*Microscopic characteristics*

<b>Maturity Stages</b>	<b>Females</b>	<b>Males</b>
Immature	Unyolked	Spermatogonia
Development	Cortical alveoli stage	Spermatocyte
Spawning	Migratory nucleus stage and hydrated oocytes	Spermatozooids
Post-spawning	Post-ovulatory follicles and atresia	Empty seminiferal ducts
Resting	Perinucleolar stage and atresia	Spermatocyte

Our **Female Macroscopic Maturity Stage Key** has been validated by the means of **histology**

# HAKE – STATE of the ART

## Microscopic Maturity Stage Key

### *Microscopic characteristics*

<b>Maturity Stages</b>	<b>Females</b>	<b>Males</b>
Immature	Unyolked	Spermatogonia
Development	Cortical alveoli stage	Spermatocyte
Spawning	Migratory nucleus stage and hydrated oocytes	Spermatozooids
Post-spawning	Post-ovulatory follicles and atresia	Empty seminiferal ducts
Resting	Perinucleolar stage and atresia	Spermatocyte



**Macroscopically we cannot distinguish between this two stages (Immature and Resting)**

# HAKE – STATE of the ART

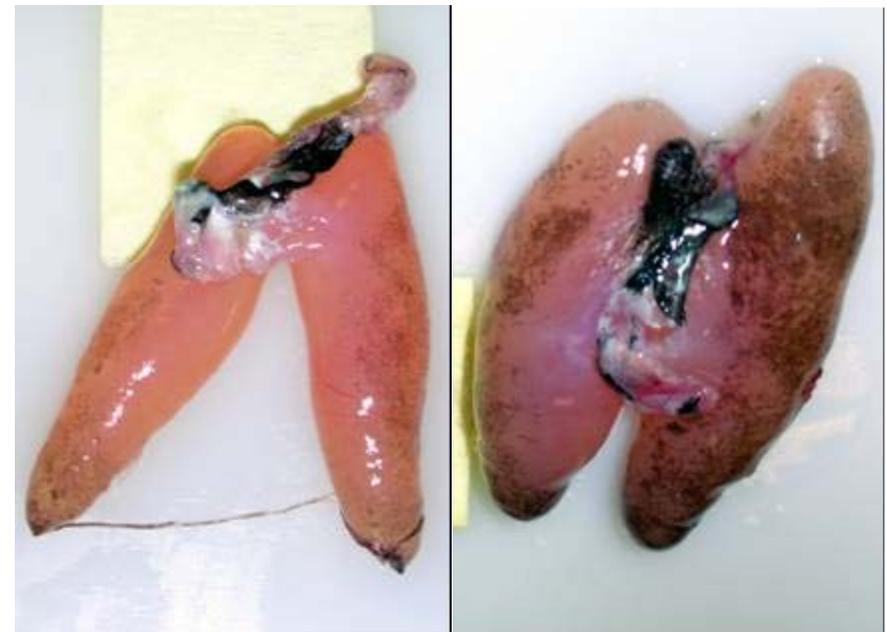
## Macroscopic Maturity Stage Key

Find the differences:

Immature



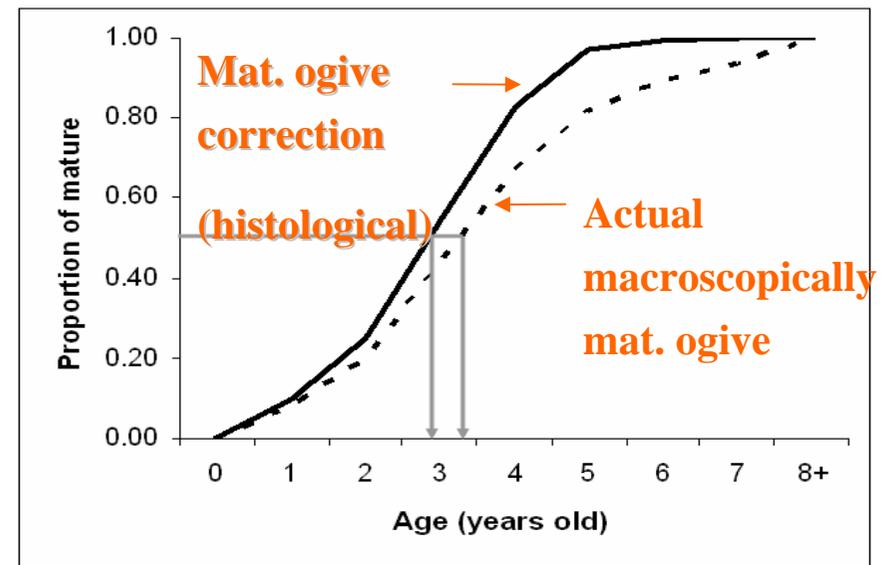
Resting



# HAKE – STATE of the ART

- ❑ Macroscopically, both ovaries (virgin/resting) show no signs of development
- ❑ The distinction is only possible after histological analysis

Assuming that 50% of immature fish classified based on a macroscopic scale are resting mature. The SSB is underestimated. The SSB estimated is 10.900, while with the resting mature correction is around 13.100 tones.



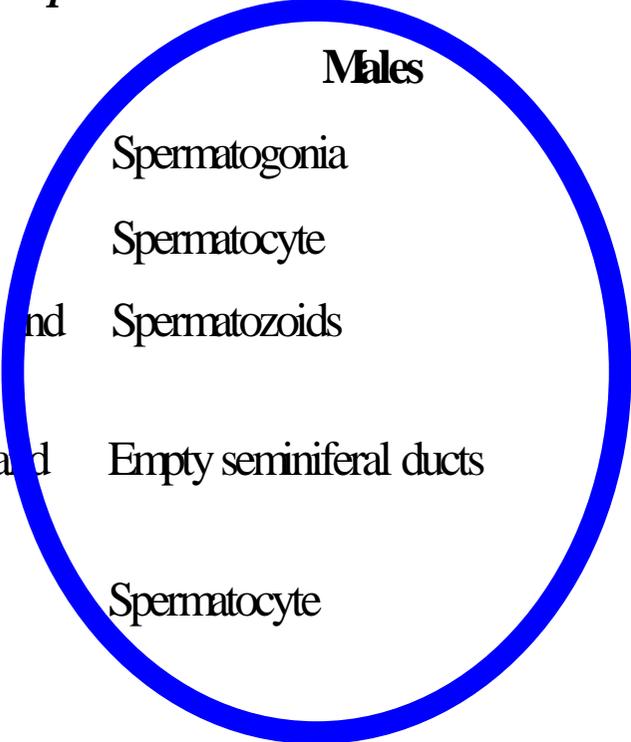
**SOUTHERN HAKE STOCK ASSESSMENT NEED FEMALE GONADS HISTOLOGY TO HAVE AN ACCURATE SSB ESTIMATION**

# HAKE – STATE of the ART

## Microscopic Maturity Stage Key

*Microscopic characteristics*

<b>Maturity Stages</b>	<b>Females</b>	<b>Males</b>
Immature	Unyolked	Spermatogonia
Development	Cortical alveoli stage	Spermatocyte
Spawning	Migratory nucleus stage and hydrated oocytes	Spermatozooids
Post-spawning	Post-ovulatory follicles and atresia	Empty seminiferal ducts
Resting	Perinucleolar stage and atresia	Spermatocyte



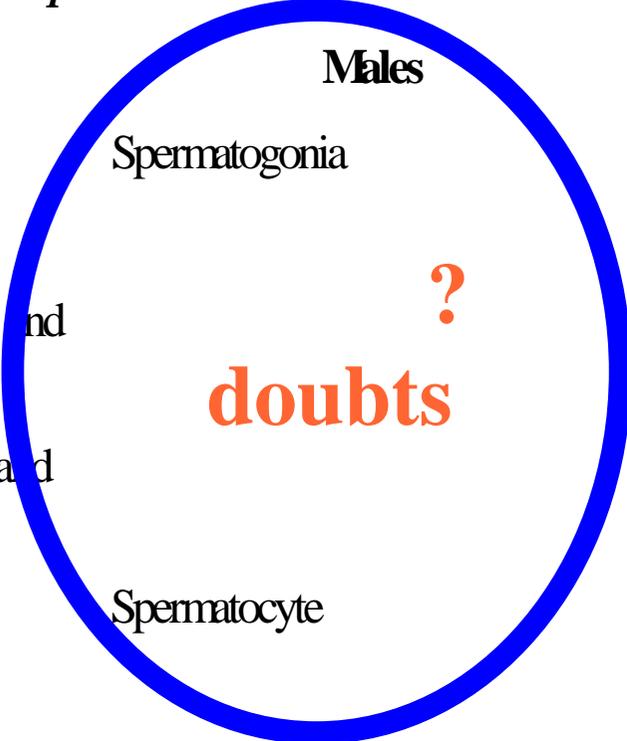
We are starting to analyse the  
males microscopic structures

# HAKE – STATE of the ART

## Microscopic Maturity Stage Key

*Microscopic characteristics*

Maturity Stages	Females	Males
Immature	Unyolked	Spermatogonia
Development	Cortical alveoli stage	
Spawning	Migratory nucleus stage and hydrated oocytes	?
Post-spawning	Post-ovulatory follicles and atresia	<b>doubts</b>
Resting	Perinucleolar stage and atresia	Spermatocyte



We are starting to analyse the  
males microscopic structures

# HAKE – STATE of the ART

Histological gonads identification should be used to the **assessment**:

- **Maturity ogives**

**Should we use:**

**Females** on the maturity ogives

**or**

**Females + Males** on the maturity ogives

# HAKE – STATE of the ART

Histological gonads identification should be used to the **assessment**:

- **Maturity ogives**

**Should we use:**

**Females** on the maturity ogives

?

**doubts**

**Females + Males** on the maturity ogives

**ANEXO 2 – XIV**

**“HORSE MACKEREL – State of the ART” – Costa, A. M., 2007**

# Horse-Mackerel – STATE of the ART

## Microscopic Maturity Stage Key

### *Microscopic characteristics*

<b>Maturity Stages</b>	<b>Females</b>	<b>Males</b>
Immature	Small ovaries with unyolked oocytes	Seminiferal ducts with primordial germinal cells
Early ripening	Bigger unyolked oocytes and yolked oocytes	Mass of primordial germinal cells, with a nucleus with a big nucleolus; presence of smaller cells with few cytoplasm (spermatogonia)
Late ripening	Migrated nucleus stage oocytes	Primary and secondary spermatocytes and other smaller and spherical cells (spermatides)
Ripening	Hydrated oocytes	Seminiferal ducts full of spermatozoids
Partly spent	Post-ovulatory follicles and atresia	Seminiferal ducts with thick walls and yet a lot of spermatozoids
Spent/ Recovering spent	Atretic and unyolked oocytes	Seminiferal ducts with thicker walls and empty spaces left by the reabsorption of the spermatozoids

**Our Macroscopic Maturity Stage Key**  
has been validated by the means of **histology**

# Horse-Mackerel – STATE of the ART

## Microscopic Maturity Stage Key

Maturity Stages	<i>Microscopic characteristics</i>	
	Females	Males
Immature	Small ovaries with unyolked oocytes	Seminiferal ducts with primordial germinal cells
Early ripening	Bigger unyolked oocytes and yolked oocytes	Mass of primordial germinal cells, with a nucleus with a big nucleolus; presence of smaller cells with few cytoplasm (spermatogonia)
Late ripening	Migrated nucleus stage oocytes	Primary and secondary spermatocytes and other smaller and spherical cells (spermatides)
Ripening	Hydrated oocytes	Seminiferal ducts full of spermatozooids
Partly spent	Post-ovulatory follicles and atresia	Seminiferal ducts with thick walls and yet a lot of spermatozooids
Spent/ Recovering spent	Atretic and unyolked oocytes	Seminiferal ducts with thicker walls and empty spaces left by the reabsorption of the spermatozooids

All studies until now are focus on  
females microscopic maturity stages

# Horse-Mackerel – STATE of the ART

## Microscopic Maturity Stage Key

### *Microscopic characteristics*

#### **Maturity Stages**

#### **Females**

#### **Males**

Immature

Small ovaries with unyolked oocytes

Seminiferal ducts with primordial germinal cells

Early ripening

Bigger unyolked oocytes and yolked oocytes

Mass of primordial germinal cells, with a nucleus with a big nucleolus; presence of smaller cells with few cytoplasm (spermatogonia)

Late ripening

Migrated nucleus stage oocytes

Primary and secondary spermatocytes and other smaller and spherical cells (spermatides)

Ripening

Hydrated oocytes

Seminiferal ducts full of spermatozooids

Partly spent

Post-ovulatory follicles and atresia

Seminiferal ducts with thick walls and yet a lot of spermatozooids

Spent/ Recovering spent

Atretic and unyolked oocytes

Seminiferal ducts with thicker walls and empty spaces left by the reabsorption of the spermatozooids

**males microscopic structures**

# Horse-Mackerel – STATE of the ART

## Microscopic Maturity Stage Key

### *Microscopic characteristics*

#### **Maturity Stages**

#### **Females**

#### **Males**

Immature

Small ovaries with unyolked oocytes

Seminiferous ducts with  
.....

Early ripening

Bigger unyolked oocytes and  
yolked oocytes

Late ripening

Migrated nucleus stage oocytes

?

Ripening

Hydrated oocytes

**doubts**

Partly spent

Post-ovulatory follicles and  
atresia

Spent/ Recovering spent

Atretic and unyolked oocytes

.....  
the reabsorption of the  
spermatozooids

**males microscopic structures**

# Horse-Mackerel – STATE of the ART

**Histological females gonads** identification used to:

• **Assessment**



Maturity ogives

• **DEPM**



Batch fecundity



Spawning fraction

# Horse-Mackerel – STATE of the ART

**Histological females gonads** identification used to:

• **DEPM**



Spawning fraction

Females with

Migratory nucleus  
stage oocytes

or

Hydrated oocytes

or

POF's



# Horse-Mackerel – STATE of the ART

Histological females gonads identification used to:

• **DEPM**



Spawning fraction

Females with



Migratory nucleus  
stage oocytes



or

Hydrated oocytes

or



POF's

?

doubts

Best

methodology

# Horse-Mackerel – STATE of the ART

Spawning fraction POF's methodology

**Problems** concerning to this application

- horse-mackerel **don't have a daily spawning hour**
- POF's involution process is **temperature-dependent**
- until we don't make **laboratory experiments** to achieve a POF's involution stage key

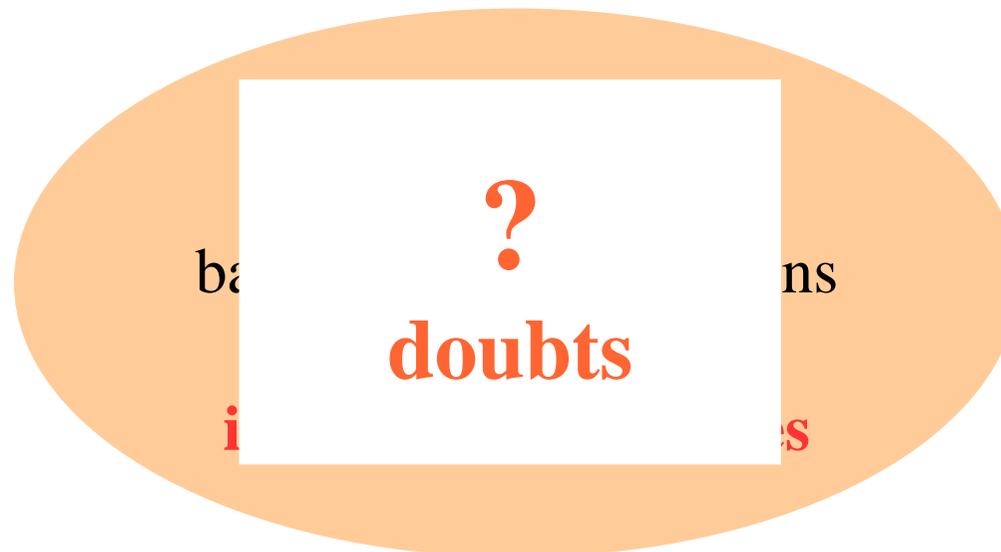
We developed a  
**POF's stage scale key**  
based on the descriptions  
for other  
**indeterminate species**

# Horse-Mackerel – STATE of the ART

Spawning fraction POF's methodology

**Problems** concerning to this application

- horse-mackerel **don't have a daily spawning hour**
- POF's involution process is **temperature-dependent**
- until we don't make **laboratory experiments** to achieve a POF's involution stage key

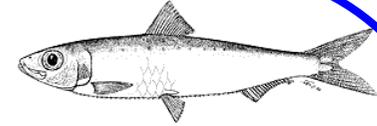


## **ANEXO 2 – XV**

“Histologia aplicada às gónadas de sardinha” – Nunes C.; Silva, A.; Soares, E.; Gantias, K. e Stratoudakis, Y., 2007



Species: **Sardina pilchardus** Walbaum, 1792



➤ **Samples collected and processed for histology work in IPIMAR:**

Mainly from DEPM surveys (1988, 1997, 1999, 2002, 2005; on the whole, ca. 4600 female gonads) near the peak spawning period; other smaller samples from harbours and acoustic surveys at different periods of the year

➤ **Objectives:**

Mainly for SSB estimation using the Daily Egg Production Method (DEPM); for other studies (macroscopic and microscopic maturity scales calibration, batch fecundity variation, dynamics reproductive cycle,...)

➤ **Fixation/Preservation technique:**

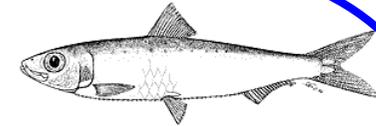
- Gonad samples from surveys: removed from fresh sardine and immediately preserved
- Gonad samples from harbours: until 2002, sardine were preserved *in toto*; after 2002, gonads are removed from fresh sardine and immediately preserved
- Until 1999, AFA was used. After 1999, 4% formalin became the main fixative solution. Gonads preserved in 70° ethanol

➤ **Histology technique:**

- Samples embedded mainly in paraffin; some samples (1/2 1999 DEPM, macroscopic and microscopic maturity scales calibration) embedded in resin (Technovit 7100)
- Staining: mainly with Hematoxilin-Eosin; some with toluidine blue; some with PAS



Species: **Sardina pilchardus** Walbaum, 1792



➤ **Routine histological analysis of female gonads:**

Each histological slide is examined for:

- The microscopic maturity stage (1 to 5 stages)
- The most advanced oocyte batch (1 to 8 stages)
- The presence of POF and estimation of the POF daily cohort (using histomorphological – granulosa and theca shapes - and biometrical – POF cross-sectional area - criteria)
- The presence of atresia and identification of the atretic stages (alpha, beta, gamma, delta)

➤ **Main current issues in sardine histology:**

- Methodology issues: fixation problems (best fixative solution; how to reduce the tissues loss of water; preservation in the fixative solution or transfer to 70° ethanol)
- Identification/classification issues:
  - Correct identification of immature/virgin vs resting individuals
  - Histological identification of oocyte development (spec. nuclear migration, hydration), POF daily cohorts and atretic stages
  - Distinction between POF and atretic structures (very “old” POF; other stainings)
- Biological issues:
  - Use of other spawning event indicators than POF to estimate spawning fraction (nuclear migration, hydrated oocytes)
  - The possibility of having two distinct POF daily cohorts in the same histological slide
  - Temperature effect on spawning fraction determination

**ANEXO 2 – XVI**

“Squid fecundity – females” – Pereira, J., 2007

# Squid Fecundity

females

# Background 1

- 5 stages of maturation (Boyle & Ngoile, 1993)
- Mature (st. 4 & 5) found year-round
  - Main peak in June-September (Moreno et al., 2002)
- Oocytes found in all stages of development in the last 2 stages of maturity
- Oocytes recruit out of the ovary in stage 4 and 5 to be stocked before spawning

# Background 2

- A tendency for females to retard growth when maturing (Moreno et al., 2007)

# Objectives

- To determine fecundity (**total**/partial)
  - To obtain fecundity time-series
- To compare fecundity to biological characteristics
  - Backup retarded growth hypothesis
  - Determine if fecundity changes with body size
  - Determine if oocyte size changes with body size/fecundity

# Constraints

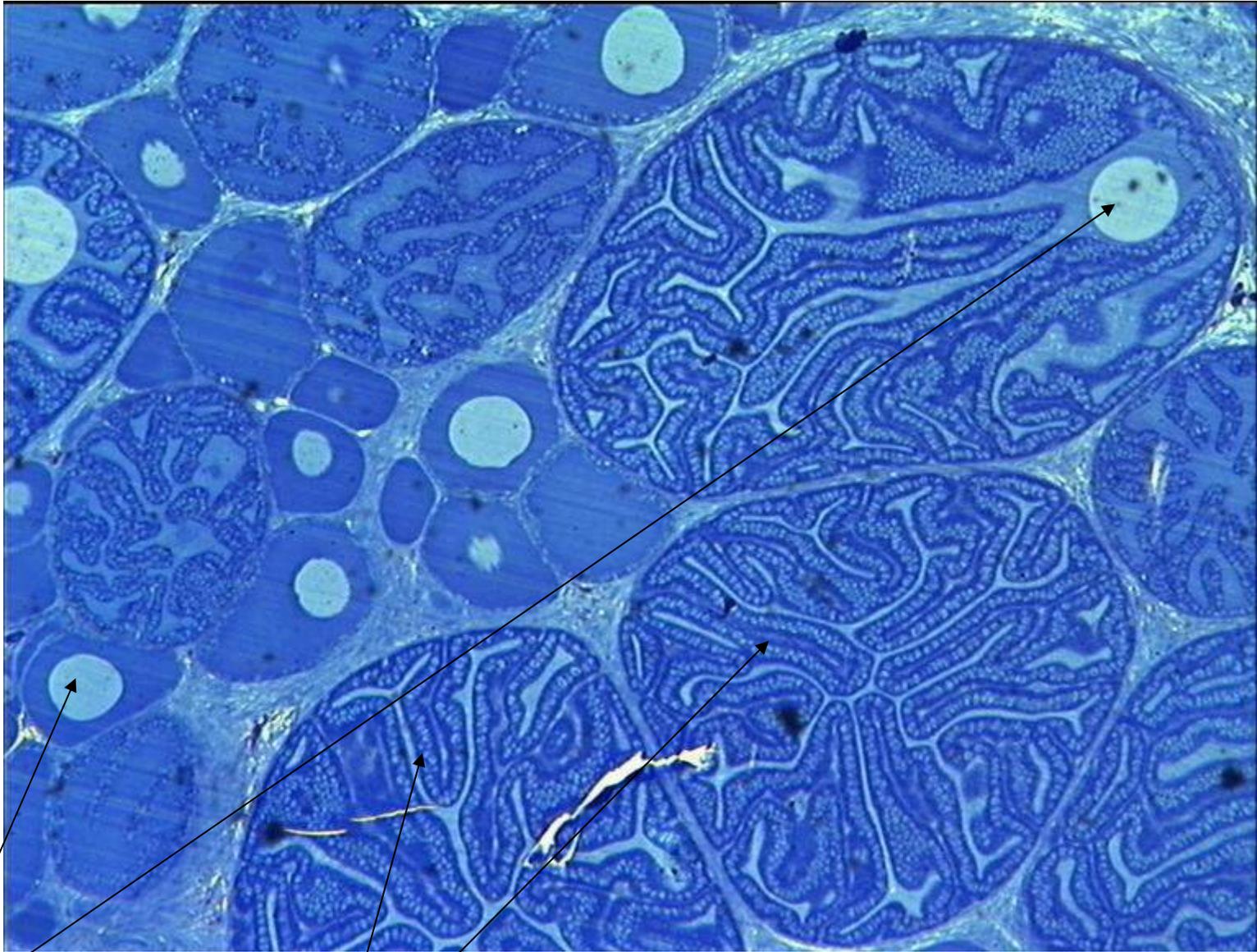
- Historical collection in sub-standard conservation conditions
- Characteristics of the ovary recommend the use of resins as the embedding medium, rather than parafin

# Results so far I

- Sections are used to determine number of oocytes
- Total number in ovary estimated from all sizes
  - Not clear how many or which will be ovulated
  - Pre-spawning condition preferred because no need to find POFs

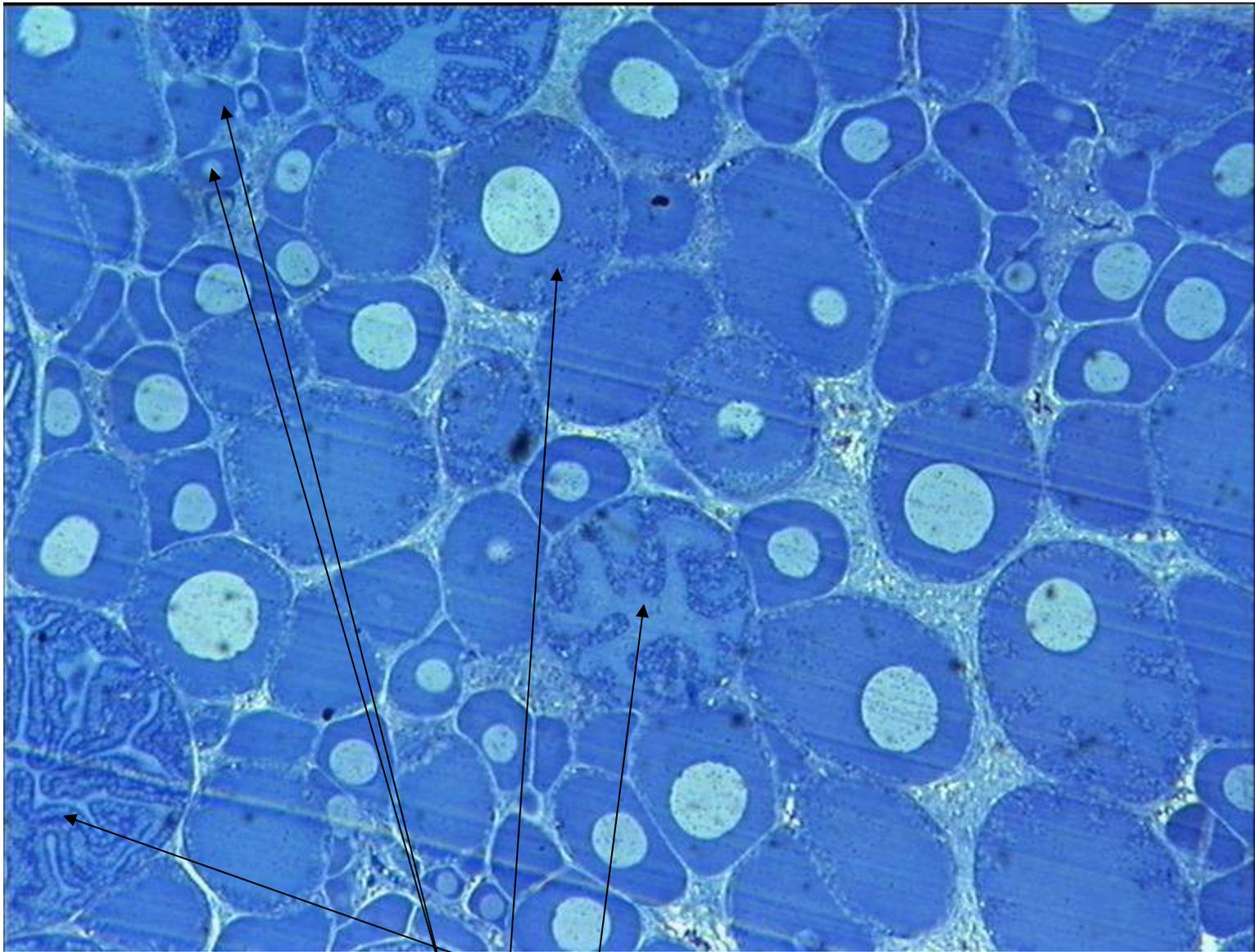
# Results so far II

- No clear indications of POFs, which are likely to be quickly resorbed after ovulation (Melo & Sauer, 2007)
- Nuclei often not in center
  - Not used to determine oocyte size
  - Greater error in the calculations of the number of oocytes



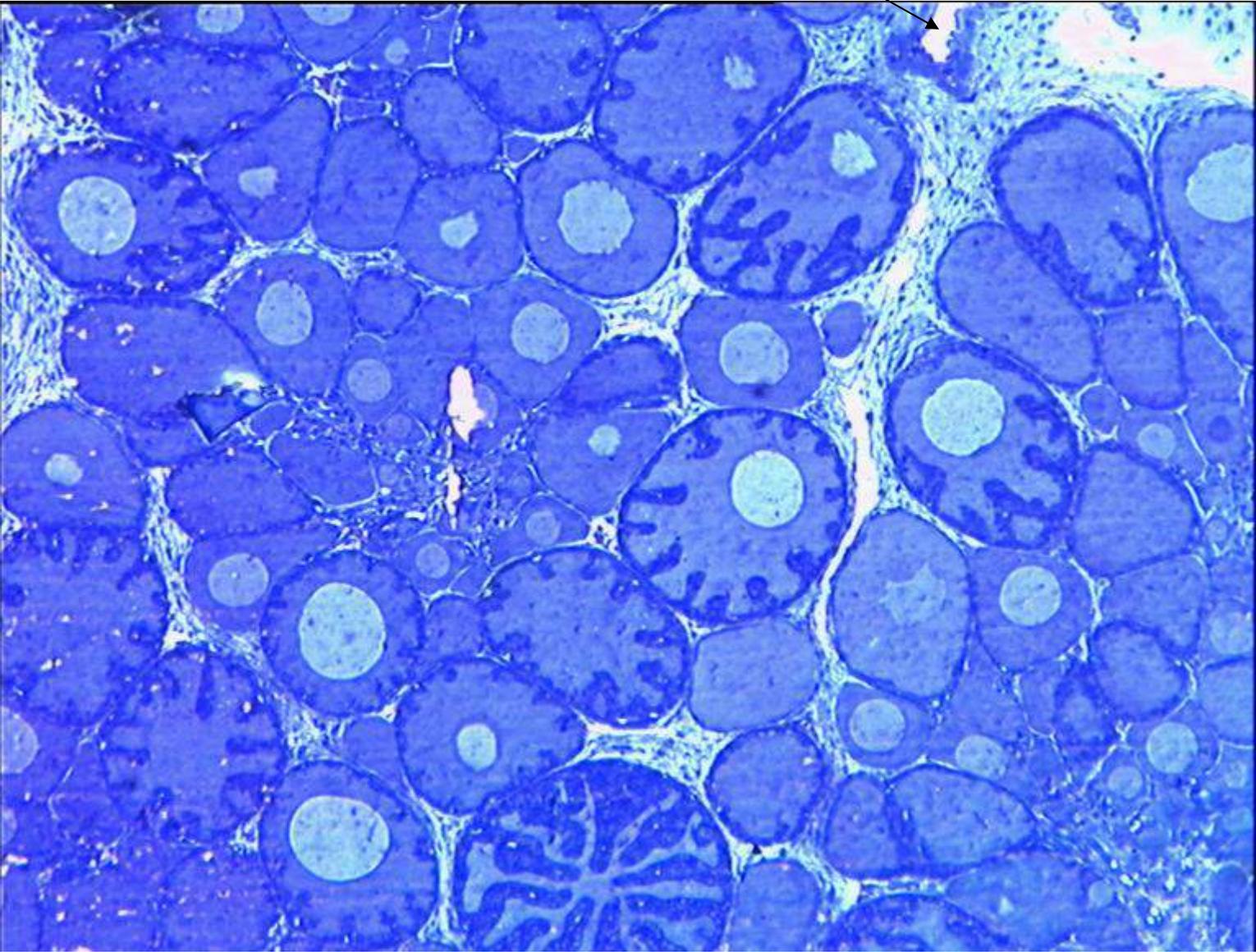
Nucleus

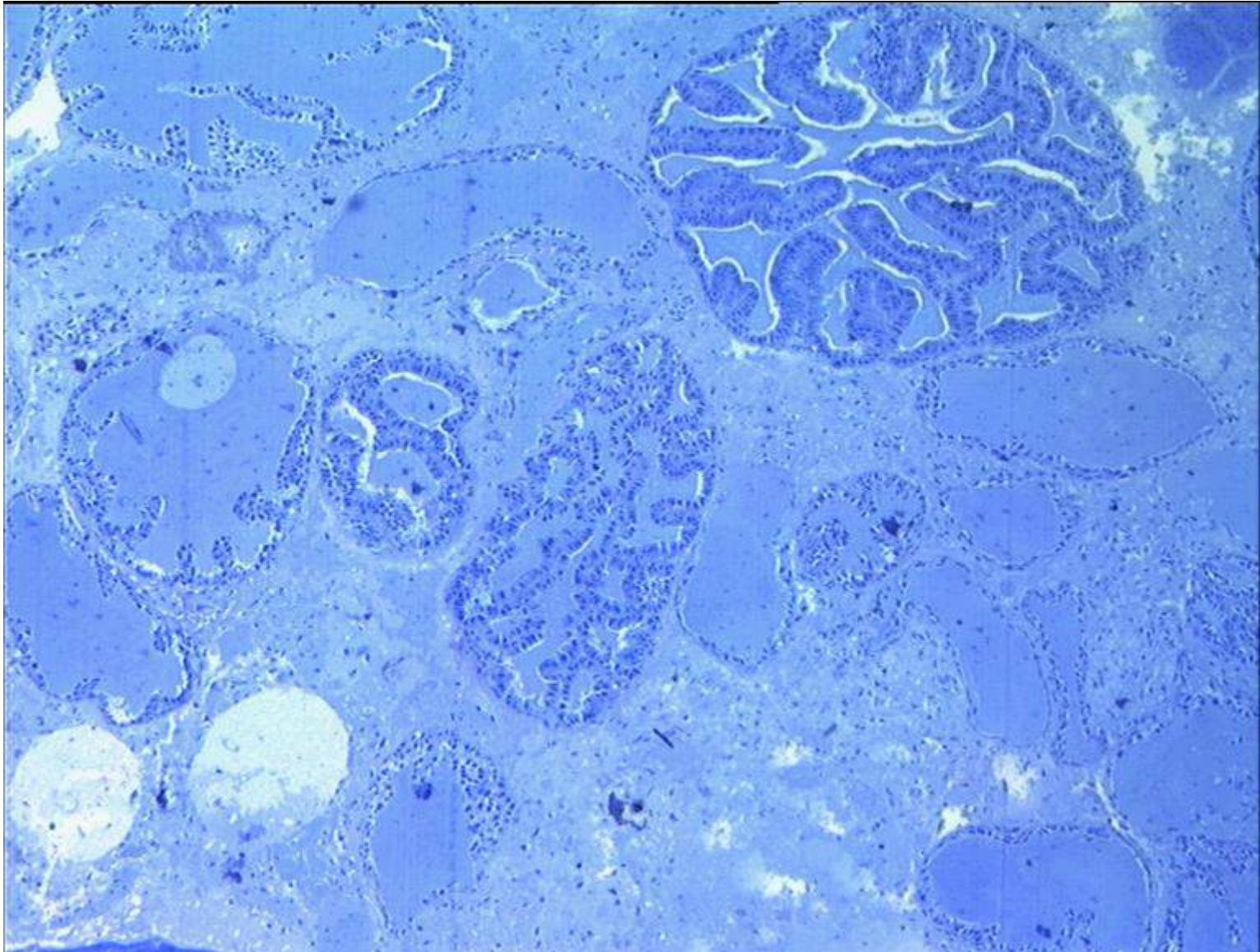
Invaginations of the membrane



Many stages of development: I/II; III; IV/V

POF ?





Frozen specimens

## ANEXO 2 – XVII

“Histological classifications of the pacific sardine (*Sardinops sagax*) ovary”

(Poster) – Macewicz, B.

# Histological Classifications Of The Pacific Sardine (*Sardinops sagax*) Ovary

Beverly J. Macewicz

Southwest Fisheries Science Center, National Marine Fisheries Service, NOAA  
8604 La Jolla Shores Drive, La Jolla, CA 92037-1508  
E-mail address: Bev.Macewicz@noaa.gov

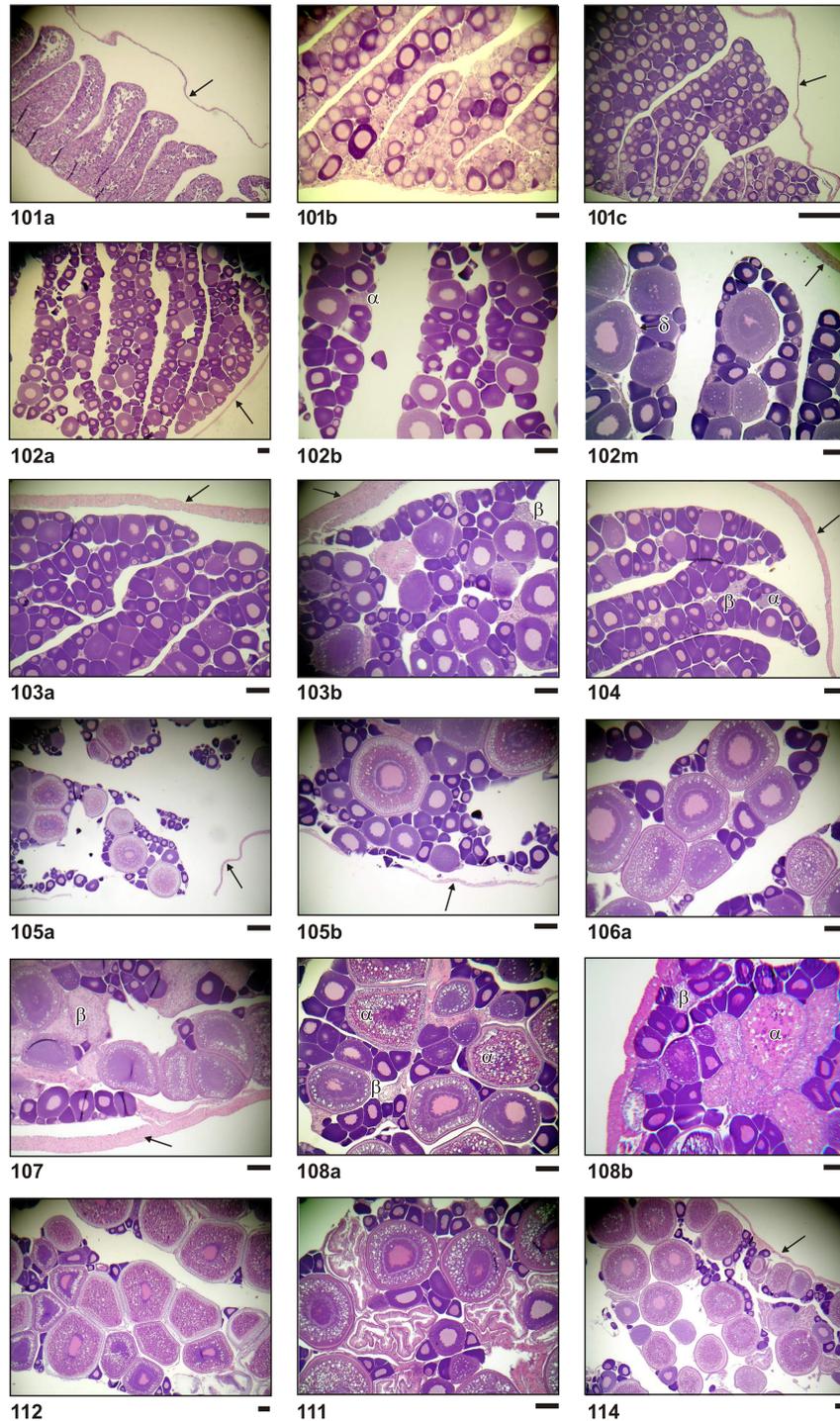


Figure 1. Photomicrographs of Pacific sardine (*Sardinops sagax*) ovarian tissue. Labels indicate code described in Table 2. Arrows point to loose ovarian wall (free of lamellae); some atresia is labeled (α and β); and bar is 0.1 mm.

Histological analysis identifies female maturity, activity (atretic states), imminent or recent spawning (spawning fraction), and those for use in estimation of batch fecundity. *Sardinops sagax* ovarian histological analyses and reproductive classification has as its basis the classification of Northern anchovy (*Engraulis mordax*) ovaries. Differences exist in *Sardinops sagax* ovaries and those seen include: lamellae only present on 2/3 of the ovarian wall, the presence of lipid globules (a.k.a. oil droplets) in developing oocytes, granulosa follicle cells that enlarge to a highly elongated columnar shape in pre-hydration oocytes (migratory-nucleus stages, MN), larger postovulatory follicles (POF) and recognizable longer (possible longer duration), beta stage atresia has lipid vacuoles, more parasites, and evidence of remnant, disintegrating hydrating oocytes. Therefore the data sheet used to record the identified structures present in the histological sections of the ovary of each female *E. mordax* in a trawl sample was modified for recording *S. sagax* ovarian histology identifications (Table 1). The data for each female entered into electronic (computer) databases.

Various combinations of the data are used to analyze adult female reproductive parameters needed for spawning biomass estimation by the daily egg production method (DEPM). Combinations may vary depending on parameter estimated. We also use knowledge of: time of daily peak spawning, when the female was captured and died (time of day and if between seasons or during what part of the spawning season), what was the recent water temperature encountered, and possible duration of criteria (oocyte stages, atresia, or degeneration of postovulatory follicles).

*S. sagax* female maturity. The combinations of histological characters that have been most useful in identifying maturity were coded (Table 2, Figure 1). If captured during the spawning season, a mature *S. sagax* females has spawned before (hours to months ago) or is capable of spawning its first batch within one to two weeks of capture. Hence, immature females have never spawned in their lifetime and may include ovaries with early yolking oocytes if the duration of further maturation (continued vitellogenesis and hydration) will take longer than a couple of weeks. An active female is a mature female that is capable of spawning (in a few hours to two weeks) or had spawned in the last 70 hours; active females are indicated histologically by presence of yolked oocytes (includes migratory nucleus or hydrated), any α atresia is < 50% of yolked oocytes, and postovulatory follicles (POF < 70 hours) may be present (codes 108-115).

Batch fecundity, the number of oocytes to be released during the next spawning. Estimation of batch fecundity is by the gravimetric method using whole oocyte preparations from females that have not begun releasing that batch. Hydrated oocytes can be counted with confidence because they provide the best visual identification (fluid uptake and yolk coalescence results in larger and translucent appearing oocytes). Histological preparation can identify the migrating nucleus and lipid droplet coalescence (Figure 2) earlier than can be seen visually in whole oocyte preparations (blocked by the dense yolk globules). The elongated granulosa cell in *S. sagax* follicles have provided an extra clue that can be seen in whole preps. Hence, we can increase the number of females we use for batch fecundity estimation.

Identification of spawning for estimation of spawning fraction. Our sampling of *S. sagax* occurs during the night between 18:00 and 06:00. During these hours, we can determine 4 spawning events (nights) based on histological criteria (Figure 2 and 3): A) spawn tomorrow night, advanced stage MN oocytes (Figure 2); B) spawning the night of capture, hydrated oocytes and/or POF without deterioration or barely begun degeneration; C) spawned last night, POF aged about 18-30 hours old; and D) spawned 2 nights before capture, POF aged about 42-56 hrs old. The postovulatory follicle of *S. sagax* has large granulosa cells that degenerate over a longer time period. This fact with a thicker theca-connective cell layer has allowed better identification of older POFs (42-56 hrs after spawning). POFs > 66 hrs are less evident (number and size), may be confused with late stage β atresia, and are not used to estimate a spawning event.

Table 1. Ovarian histological identification data sheet.

Species	Collection or Sample No.		Haul date:		Haul time:		SPAWNING STATE								ALPHA atresia	BETA atresia	diameter of most adv oocyte class (mm)	NOTES abnormal cells parasites oosiphilic disintegrating-Hyd oocytes
	ovary wall dimension of "free" side	no yolk	early yolk	advanced yolk (3 = few) (4 = many)	hydrate oocytes	Hyd new POF	mid POF	old POF	very old / beta	no yolk	early yolk	<50% yolk	≥50% yolk	(1)				
Fish No.	(1)	(2)	Granulosa cell shape: oil droplets	Nucleus migrate	(01)	(21)	(20)	(30)	(40)	(60)	(1)	(1)	(1)	(2)	(1)	(1)	(1)	(1)
code or sub-code	thin med thick	pr-primary av-cortical alveolae pd-olli-lipid droplets	begin locate beg colum Med colum lat colum	S.M.L. locate med late (at edge)	begin full	early												

Table 2. Ovarian criteria for each code and indication of female maturity.

Code	Oocyte class			Atresia				Spaw <sup>a</sup> soon or recent	♀ Maturity <sup>b</sup>	
	no yolk	early yolk	ad <sup>c</sup> vance yolk	δ	α no yolk	α early yolk	β		α adv. yolk	anytime absolute I and M
101	+								I	I
102	+			-	+				U	I or M
103	+			-	-		+		U	M
104	+			-	+		+		U	M
105	-	+		-	-				U	I or M
106	-	+		-	-		+		U	I or M
107	-	+		-	-		+		U	M
108	-	-	+	-	-	-	-	≥ 50%	M	M
109	-	-	+	-	-	-	-	≥ 50%	+	M
110	-	+		-	-	+	+		+	M
111	-	+		-	-	-	-		+	M
112	-	-	+	-	-	-	-		M	M
113	-	-	+	-	-	-	-	< 50%	M	M
114	-	-	+	-	-	-	-		+	M
115	-	-	+	-	-	-	-	< 50%	+	M

<sup>a</sup> spawn = presence of hydrated oocytes or recent POF, degeneration <70 hours after spawning  
<sup>b</sup> female: I = immature, U = uncertain (add criteria or other information to determine), M = mature  
<sup>c</sup> other data used during season: β atresia indicate mature; ovaries of immatures (some may have begun developing) have no δ atresia and thin-medium ovary walls, while ovaries of previous mature females have δ and thick walls in these classes, hence 102, 105, 106 will be split.

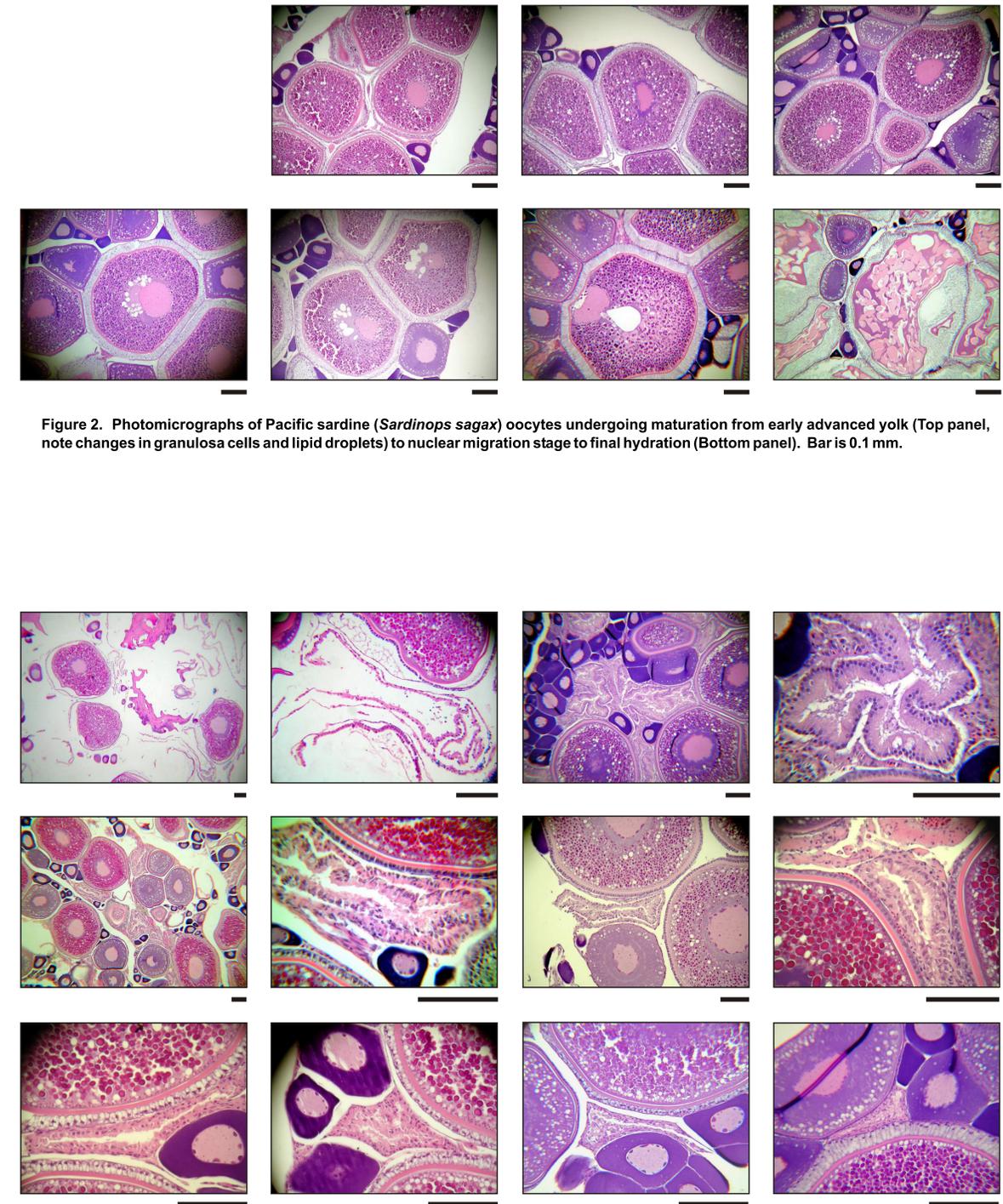


Figure 2. Photomicrographs of Pacific sardine (*Sardinops sagax*) oocytes undergoing maturation from early advanced yolk (Top panel, note changes in granulosa cells and lipid droplets) to nuclear migration stage to final hydration (Bottom panel). Bar is 0.1 mm.

Figure 3. Photomicrographs of postovulatory follicles (POFs) undergoing degeneration in ovaries of Pacific sardine (*Sardinops sagax*) females that have recently spawned. Top panel, at ovulation and few hours after spawning; middle panel, POFs about 24 hrs after spawning; and bottom panel, POFs about 48 hrs to questionable (>66 hrs/late-stage β atresia). Bar is 0.1 mm.

**ANEXO 2 – XVIII**

“Reproductive aspects of toad-fish *Lophius lastrophysus* landed in Rio de Janeiro State – Brazil” – Valentim, M. F., 2007

Reproductive aspects of toad-fish  
*Lophius gastrophysus* landed in  
Rio de Janeiro State - Brazil

Maria de Fátima Valentim



The following criteria were used:

Oocytes visibility  
Vascularization  
Occupation



Form, Color, Size



Width

## Maturity stages of *Lophius gastrophysus*

Stage	Description
I-Immature	Narrow (<2cm), in ribbon form, salmon color, no oocytes <i>visible to the</i> naked eye. Vascularization can be seen (discreet). Occupation less than 10% of abdominal cavity in the dorsal and coiled position.
II-Initial Maturation	Wider ovaries (>4cm), in ribbon form, of cream-orange color, visible oocytes immersed in a buoyant, gelatinous mass. Longer, evident vascularization. They occupy about 20% of the dorsal lateral position. In the median position they have a folded form.
III- Advanced Maturation	Orange color. Larger (>11cm) and longer. Numerous and larger oocytes. Moderate vascularization. They occupy about 30% in the dorsal lateral position and are folded and overlapped.
IV-Ripe	Yellow, numerous and larger oocytes, immersed in a buoyant, gelatinous mass. Ribbon form, wider (>16cm) longer (2m). Vascularization can be seen. They occupy about 60% in/of the dorsal lateral position and are folded and overlapped.
V-Spent	Ovaries of grayish at greenish, (<5cm) and oocytes visible whitish and opaque. High vascularization, and hemorrhagic in some parts. They occupy about 20% of the dorsal lateral position and are folded and overlapped.
VI-Recovering	Reddening cream, some and opaque smaller oocytes. Ribbon form, less wide (<5cm) and less long. Hemorrhagic. They occupy about 15%, of the dorsal lateral and coiled position.
VII-Recovered	Cream color, no oocytes visible to the naked eye. With a magnifying glass, small oocytes, less wide (<3cm) and embedded in a gelatinous mass. Ribbon form, Relatively narrow and long. Vascularization moderated. They occupy about 10% in the dorsal lateral and coiled position.

Sampling: 311 females  
Commercial trawlers fishery  
Landed - Niteroi/RJ  
April/2004 - March/2006

$L_T, W_T, \underline{W_O}, \underline{W_L}$



Gonadosomatic Index (IG)

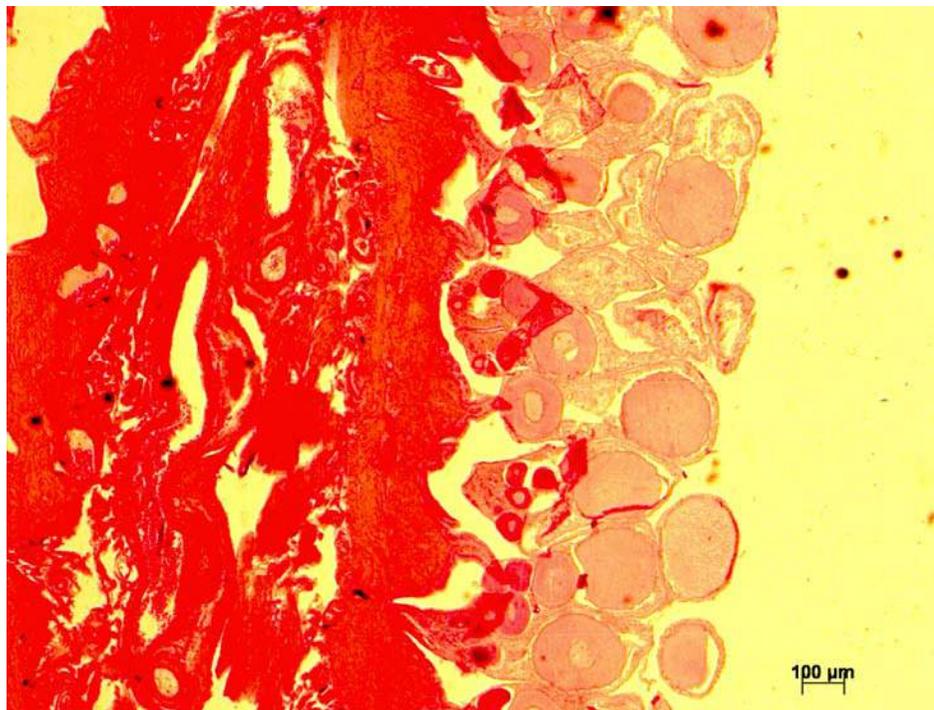
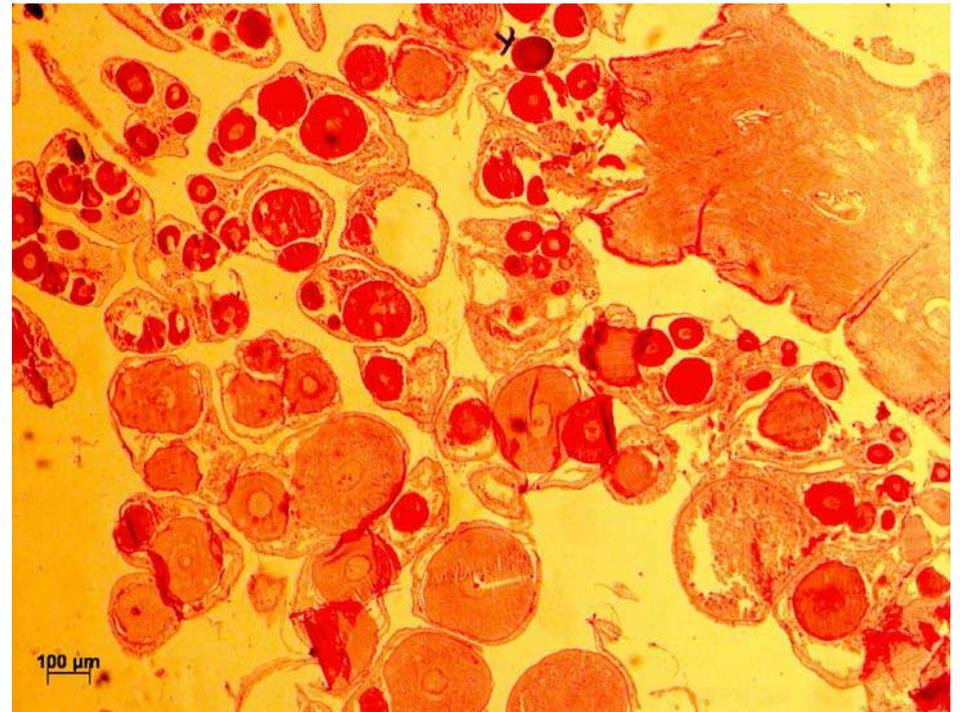
Hepatosomatic Index (IH)

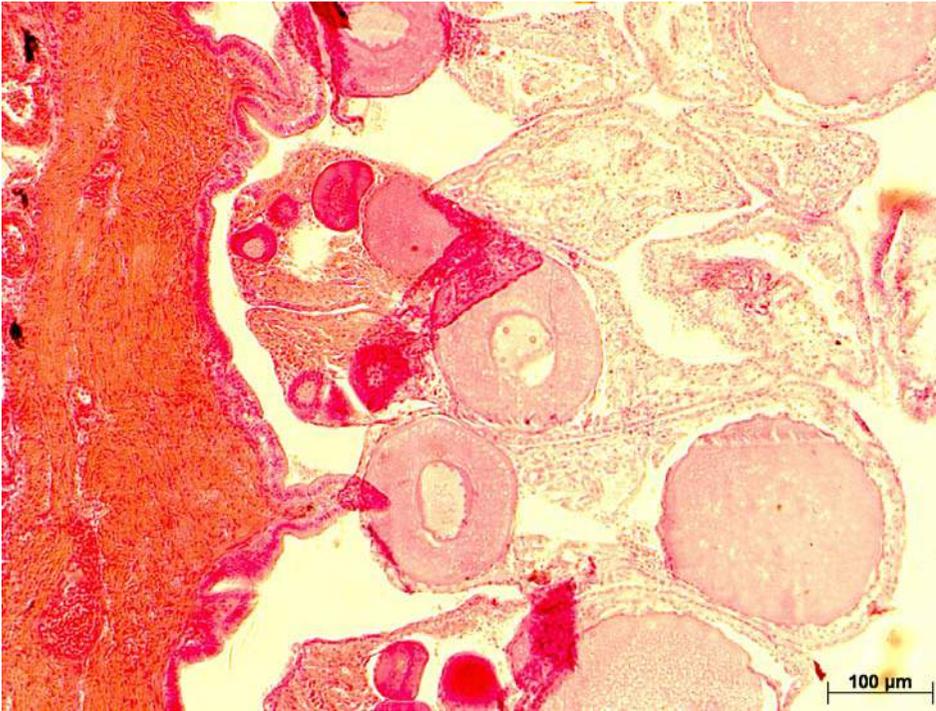
## Table:

Maturity stages	Nº	IG	IH
I-Immature	91	1,06	3,30
II- Initial maturation	85	4,09	5,21
III-Advanced maturation	36	14,02	4,22
IV-Ripe	5	21,91	3,27
V-Spent	39	3,46	3,56
VI-Recovering	43	3,07	4,56
VII-Recovered	12	1,97	4,20

Is the cellular process similar enough to the point of a junction?

What could/should be observed at a cellular level in order to accept such grouping?





**Spent stage**



**Recovering stage**

## ANEXO 2 – XIX

“Importância da colocação das gónadas de tamboril (*Lophius piscatorius*) nas cassetes de inclusão para histologia” – Silva, C., 2007



## Importância da posição de colocação das gónadas de tamboril (*Lophius piscatorius*) nas cassetes de inclusão para histologia

Carmo Silva

Workshop de Histologia, IPIMAR, 22-23 de Novembro de 2006

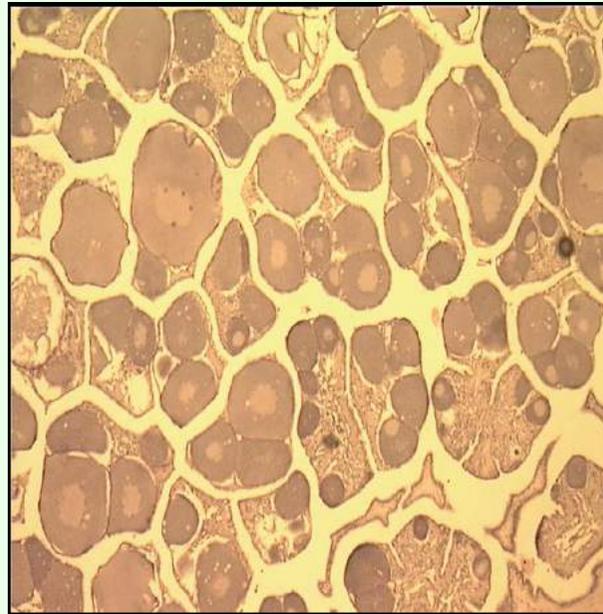
No tamboril esta estrutura difere um pouco da dos outros teleósteos. A gónada apresenta a forma de um tubo achatado cujas paredes internamente são assimétricas. Uma das paredes é a membrana ovígera de onde se formam as lamelas ovígeras – invaginações desta parede no sentido do lumen que contêm os óocitos. As lamelas acabam por se separar da parede formando pequenas bolsas com os oócitos. Apenas um oócito se desenvolve completamente acabando por ocupar quase todo o espaço da bolsa. A outra é a membrana não ovígera e nos estados iniciais de maturação está em contacto com a outra superfície da lamela ovígera, mas à medida que a maturação avança a distância entre as duas aumenta e o lumen fica cheio de muco.

Para que esta estrutura seja bem observada os cortes têm que ser transversais. Por isso os pequenos fragmentos da gónada têm que ser colocados transversalmente no bloco de parafina. Uma vez que a gónada tem a forma de uma fita por vezes isto torna-se difícil uma vez que a secção de corte é inferior ao comprimento e largura do fragmento da gónada. É necessário deixar solidificar um pouco a parafina antes de preencher o resto da forma (não demais pois pode-se comprometer a qualidade do bloco).



Posição correcta

Se não se observar transversalmente, dependendo da zona de secção, as bolsas podem ser tomadas por oócitos (só se visualiza um dos oócitos) e levar a uma errada classificação do estado de maturação. A correcta classificação só é possível com base na observação transversal. Interessa saber se há lamelas, se há bolsas, qual a distância entre as paredes, a presença de muco e a sua quantidade.



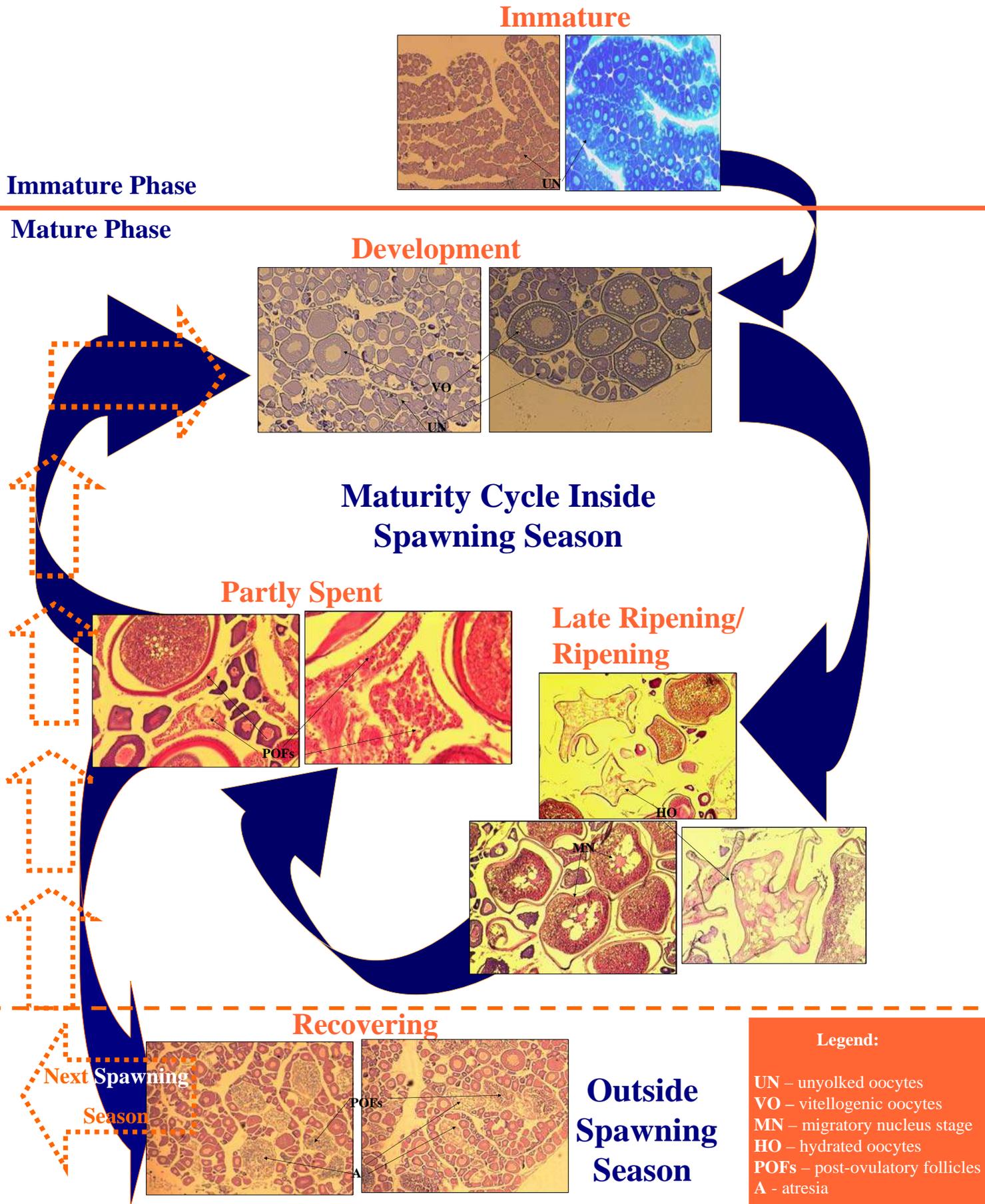
Posição incorrecta

**ANEXO 2 – XX**

“Microscopic Maturity Cycle of Females for Horse Mackerel (*Trachurus trachurus*)” (Poster) – Costa, A. M. e Gonçalves, P., 2007

# Microscopic Maturity Cycle of Females for Horse Mackerel (*Trachurus trachurus*)

Ana Costa and Patrícia Gonçalves

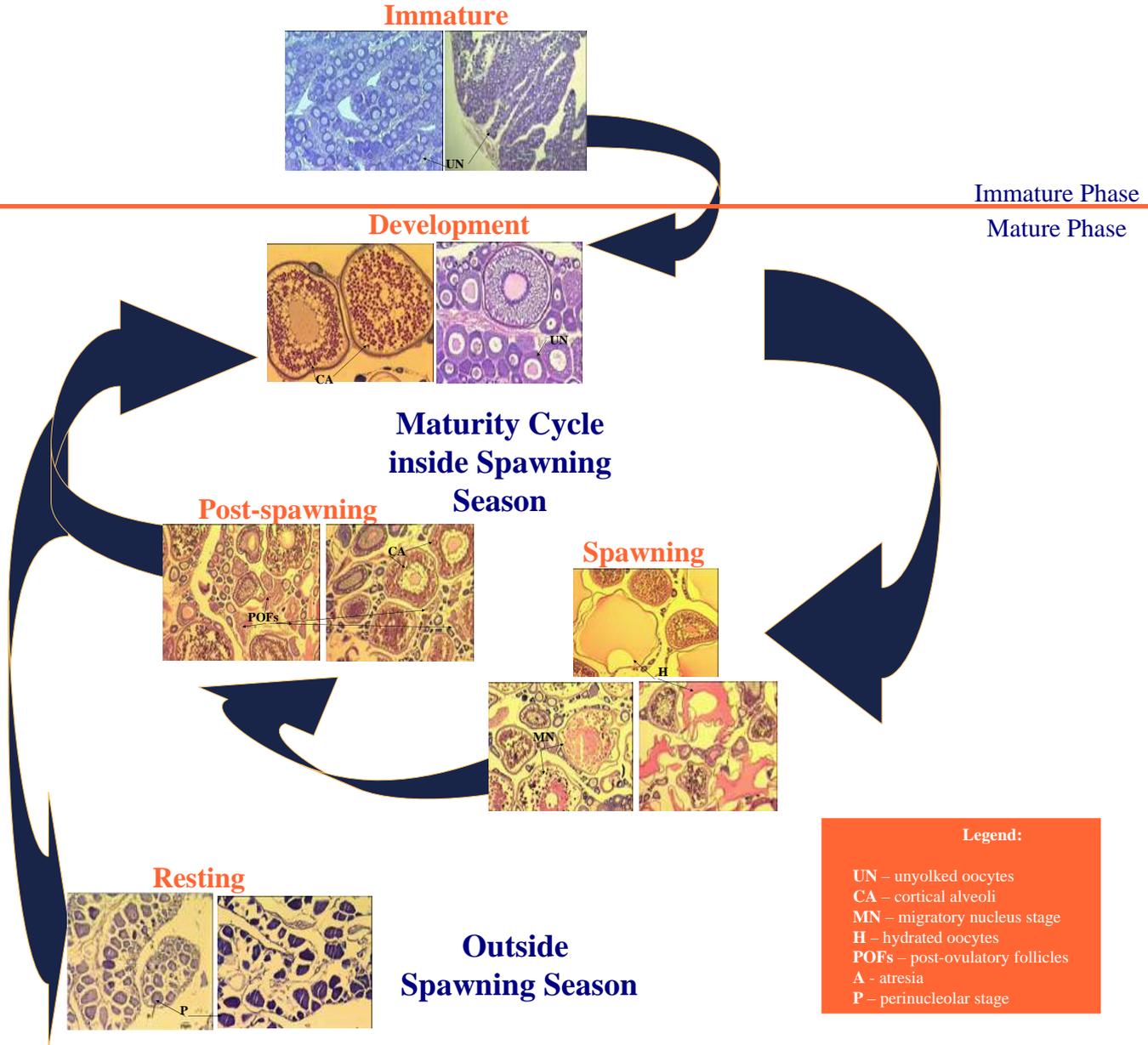


**ANEXO 2 – XXI**

“Microscopic Females Maturity Stage Key for the European Hake  
(*Merluccius merluccius*)” (Poster) – Gonçalves, P., 2007

# Microscopic Females Maturity Stage Key for the European Hake (*Merluccius merluccius*)

Patrícia Gonçalves ([patricia@ipimar.pt](mailto:patricia@ipimar.pt))



This work was carried out within the IPIMAR projects

NeoMAV (QCA-3/MARE-FEDER, <http://ipimar-iniap.ipimar.pt/neomav>) and PNAB/EU DCR – Data Collection Regulation

**ANEXO 2 – XXII**

“Phases of the reproductive cycle” – Apresentado por Pereira, B. S., 2006

## **Phases of the reproductive cycle**

English terms, to describe where a fish is within the reproductive cycle. Terms used in ms text.

Macroscopic classes

Have to be based on only those characteristics which are easily visible; these may differ with species. Need to test success rate with histological analysis

Histological stages

Name them based on the histological criterion used

Males?

**Immature**

*Gonadotropin-dependent development*

**Developing**

*Next Spawning Season*

**Regenerating**

**Spawning-capable**

*Spawning Season over*

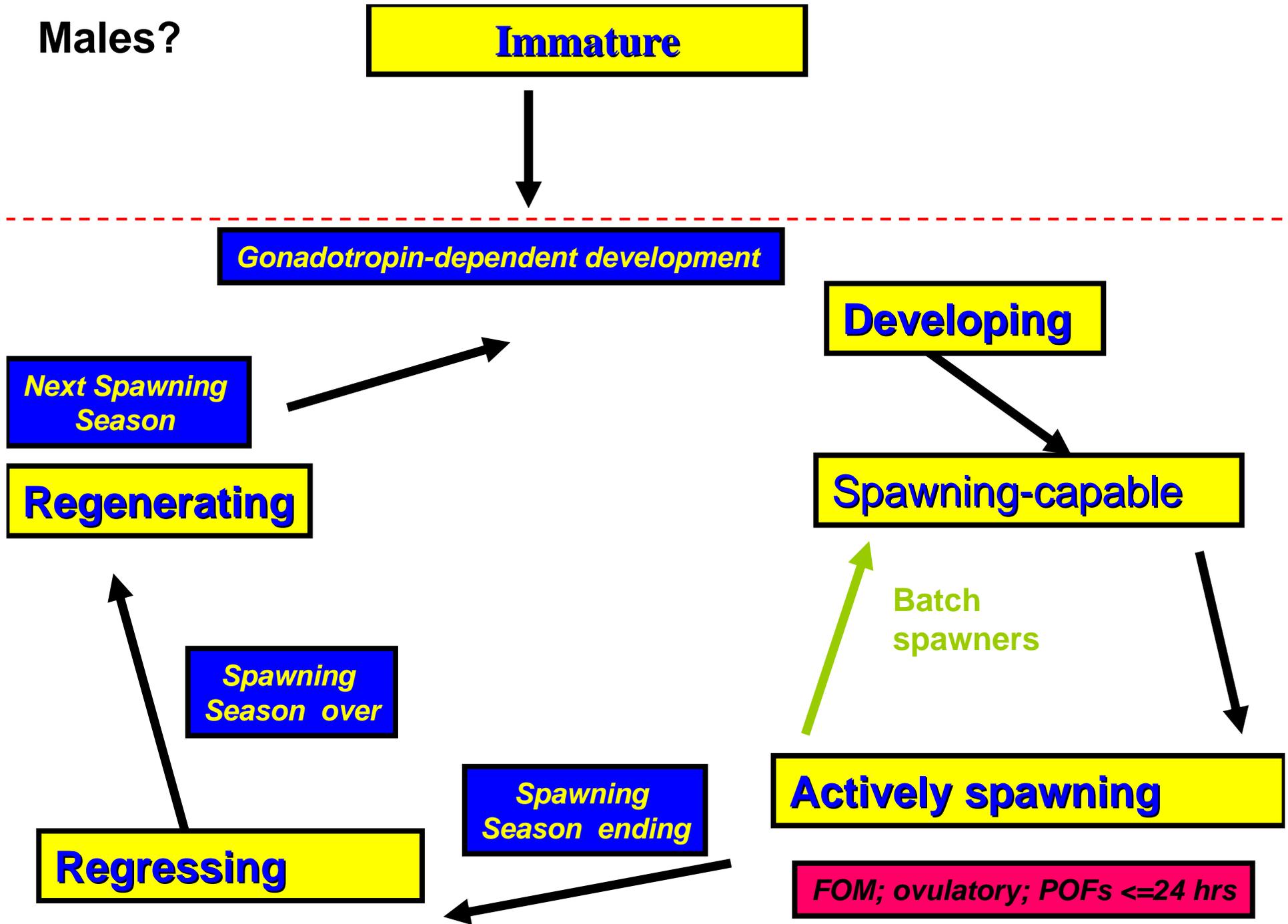
Batch spawners

*Spawning Season ending*

**Actively spawning**

**Regressing**

*FOM; ovulatory; POFs <=24 hrs*



# Where to go from here?

- (1) Share contact information
- (2) Develop a list of other scientists focusing on reproductive studies?
- (3) Password community: literature, possible histological galleries.
- (4) Paper focusing on reproductive nomenclature.
- (5) Develop a web-based training manual

**ANEXO 2 – XXIII**

“Fish Reproduction Research at the Southwest Fisheries Science Center” –  
Macewicz, B., 2007

# Fish Reproduction Research at the Southwest Fisheries Science Center

Beverly J. Macewicz

Southwest Fisheries Science Center



U.S. Department of Commerce  
National Oceanic & Atmospheric Administration  
National Marine Fisheries Service



# Outline

- Background
- Fish Species
- Update on the DEPM and Pacific sardine spawning

# Background

- SWFSC is located in La Jolla, CA
- Fisheries Resources Division
- Responsible for monitoring and stock assessment of numerous fish, squid, and abalone populations in the Pacific Ocean off the west coast of the United States
- We study fish reproduction to provide information on egg production, maturity, fecundity, age, and spawning rate necessary for assessments

# Nine Fish Species

- Similarities and Differences
- Discuss Fecundity, Spawning and Maturity

## Pacific ocean fish – reproduction studied

Common name	Scientific name	Type	Temperature approx. °C
Northern anchovy	<i>Engraulis mordax</i>	small pelagic	14- 16
Peruvian anchoveta	<i>Engraulis ringens</i>	small pelagic	14-16
Skipjack tuna	<i>Katsuwonus pelamis</i>	large pelagic	24
Pacific mackerel	<i>Scomber japonicus</i>	pelagic	16-21
Dover sole	<i>Microstomus pacificus</i>	flatfish, bottom	5
Sablefish	<i>Anoplopoma fimbria</i>	pelagic, bottom	5
Jack mackerel	<i>Trachurus symmetricus</i>	pelagic	15-18
Pacific hake	<i>Merluccius productus</i>	pelagic	7-9
Pacific sardine	<i>Sardinops sagax</i>	small pelagic	12-15

# Similarities

- Spawn pelagic eggs
- Cycles of oocyte development
- Release hydrated oocytes in a batch
- Postovulatory follicles remain in the ovary, degenerate and are absorbed
- Oocytes “die” (atresia)

# Differences

- Some fish spawn eggs with oil globules (*E.mordax* does not)
- Rate of oocyte development
- Oocyte size
- Duration between spawning events
- Number of spawnings per season

**Fecundity**

**Spawning**

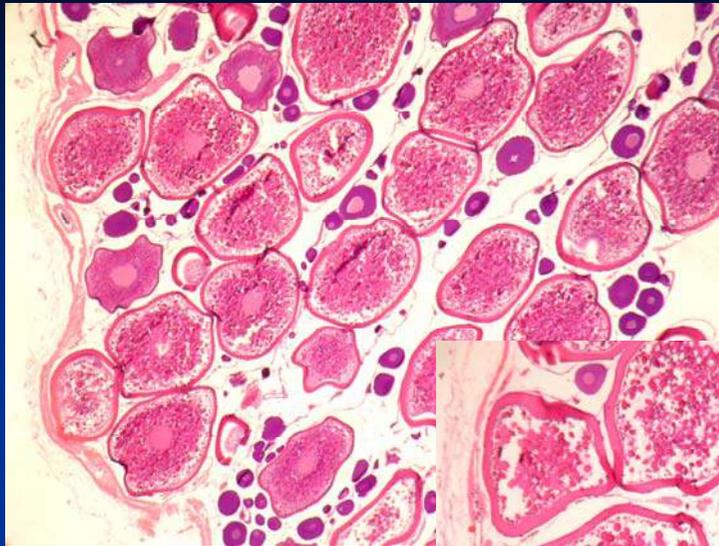
**Maturity**

# Fecundity

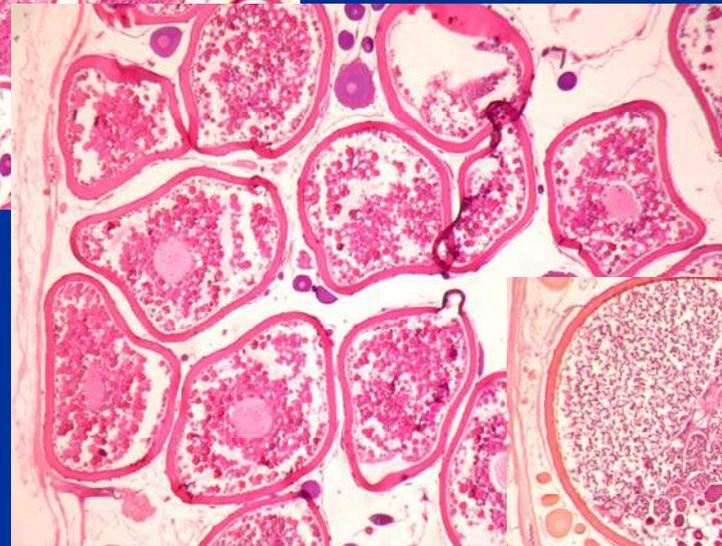
- Identify in the ovary which oocytes to count
- Potential Annual Fecundity estimation needs an advanced oocyte group separated
- Batch Fecundity estimation needs hydrated oocytes or immediate prehydration and no new POFs (not ovulating)

# Potential Annual Fecundity

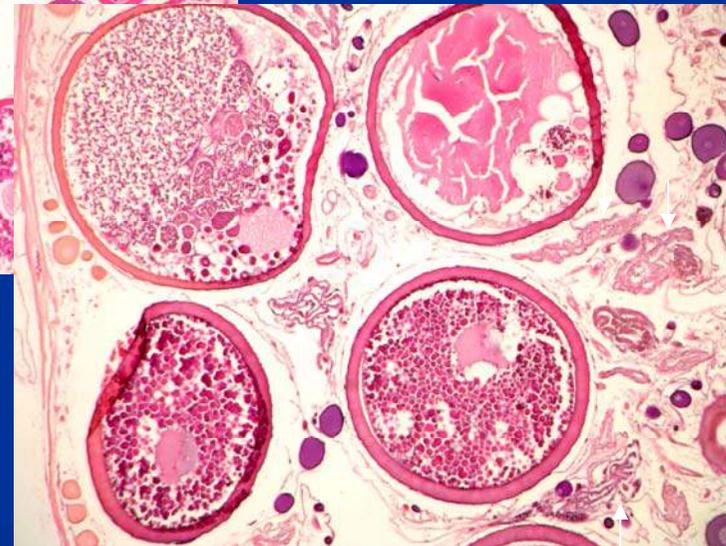
Dover sole  
*Microstomus pacificus*



Recruitment

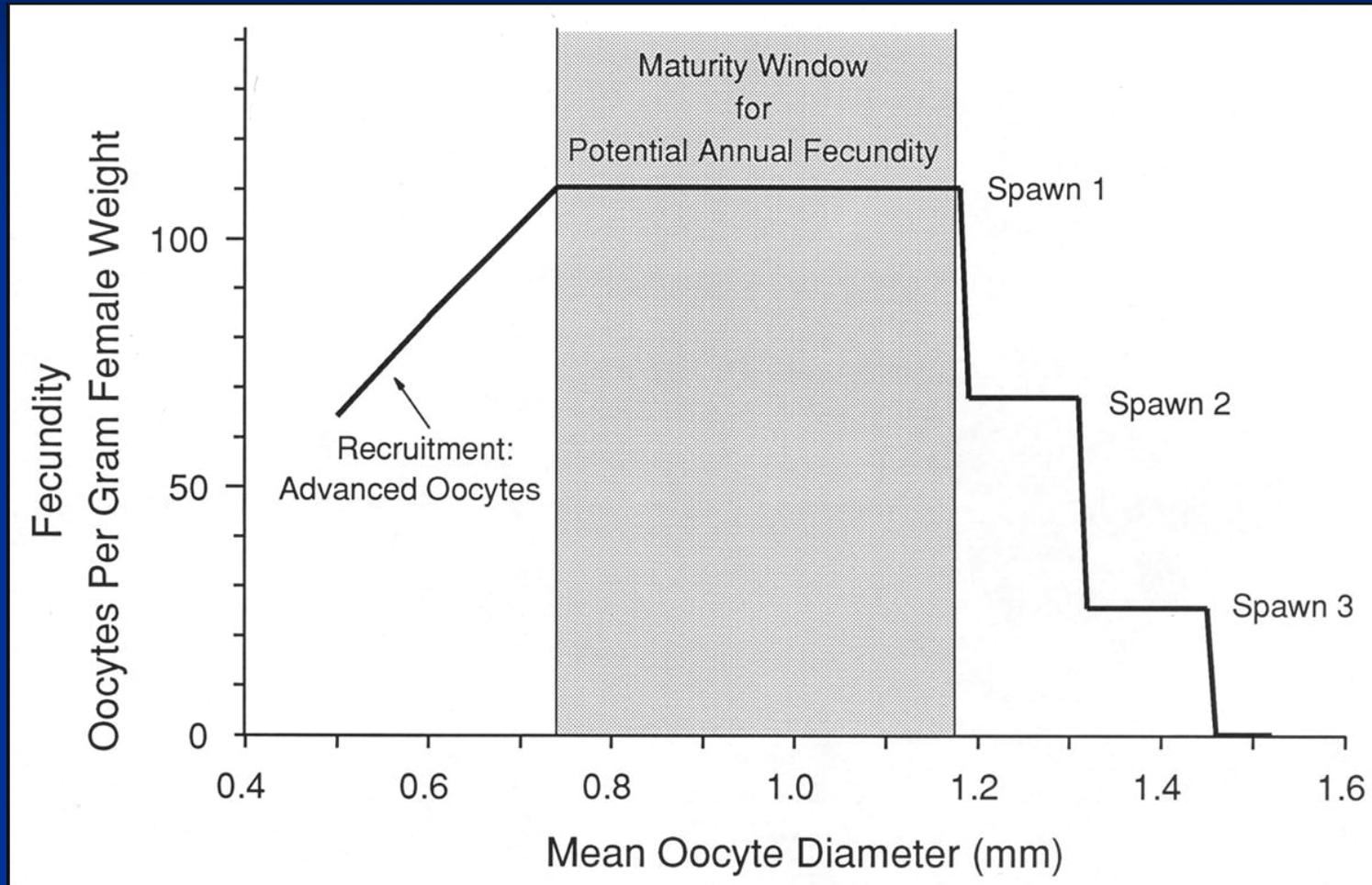


Within maturity window

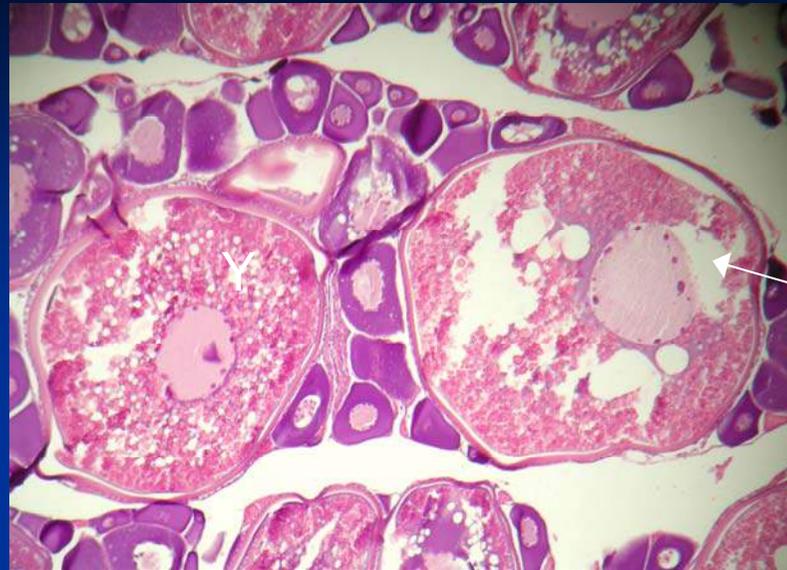


Spawning  
and Batch Fecundity

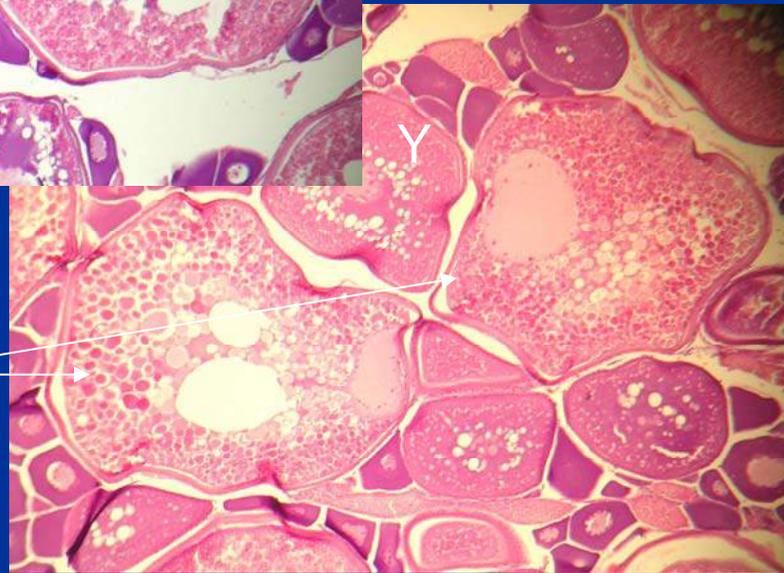
Fecundity estimation during a hypothetical cycle of oocyte maturation and spawning for a sablefish (*Anoplopoma fimbria*) female.



# Batch Fecundity

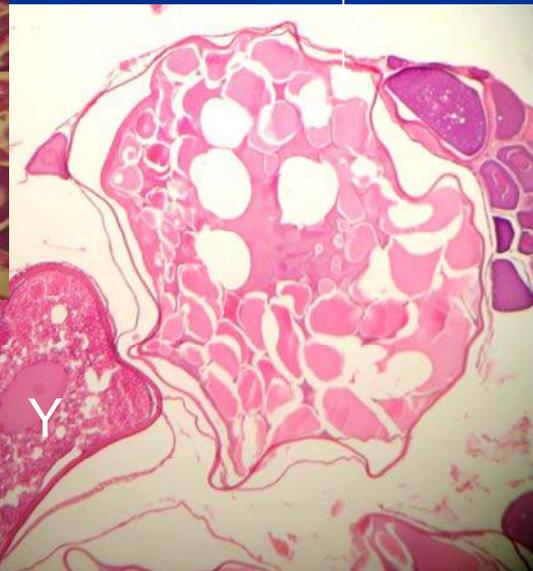


Early migratory-nucleus stage oocyte



Late migratory-nucleus stage oocytes

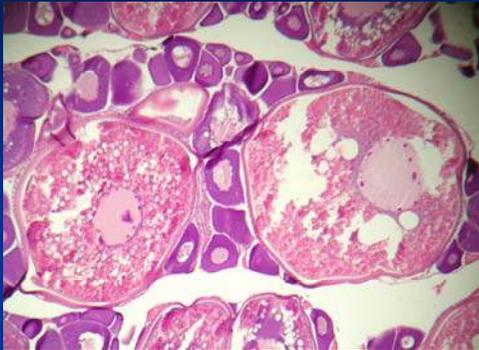
Hydrated oocyte



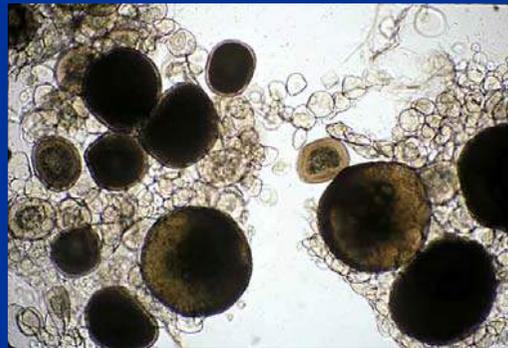
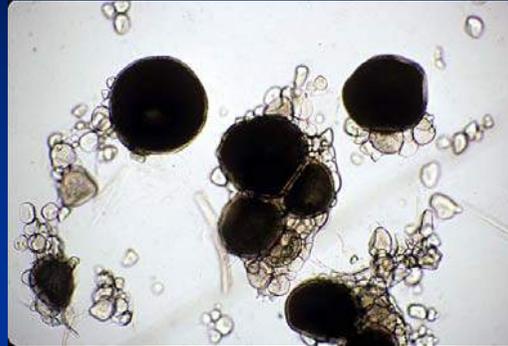
Jack Mackerel  
*Trachurus symmetricus*



Histological section



Whole oocyte preparation



Size distribution



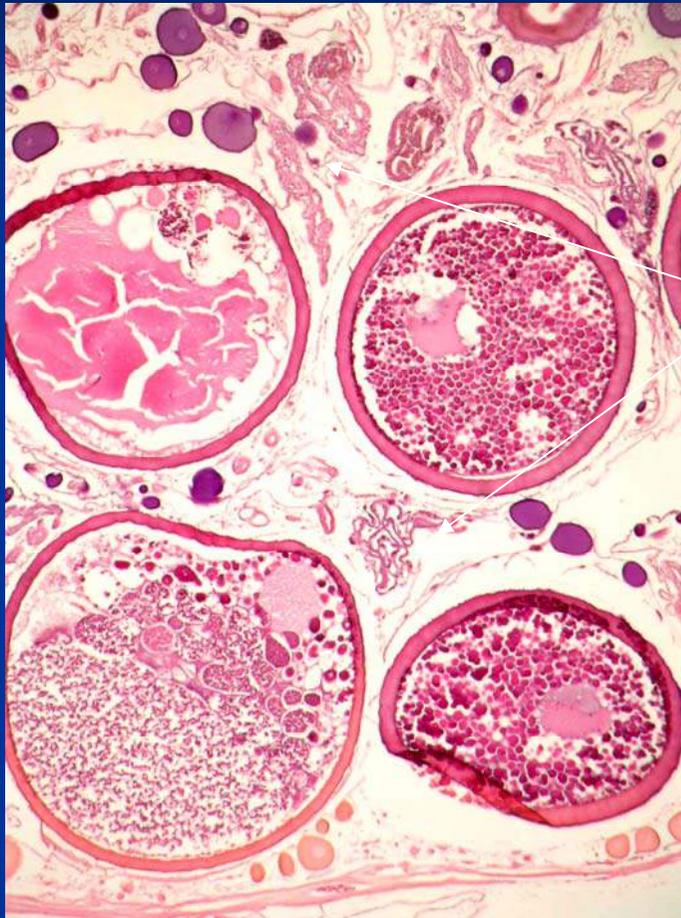
# Spawning

T or F : tomorrow, tonight or recently

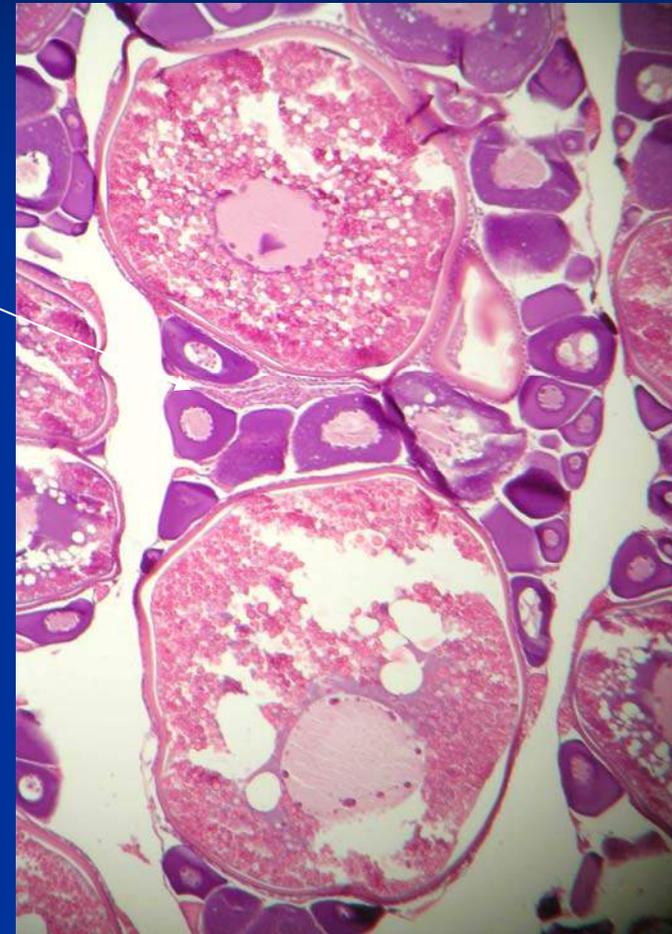
or

Daily spawning fraction

T or F : tomorrow, tonight or recently spawned



POF



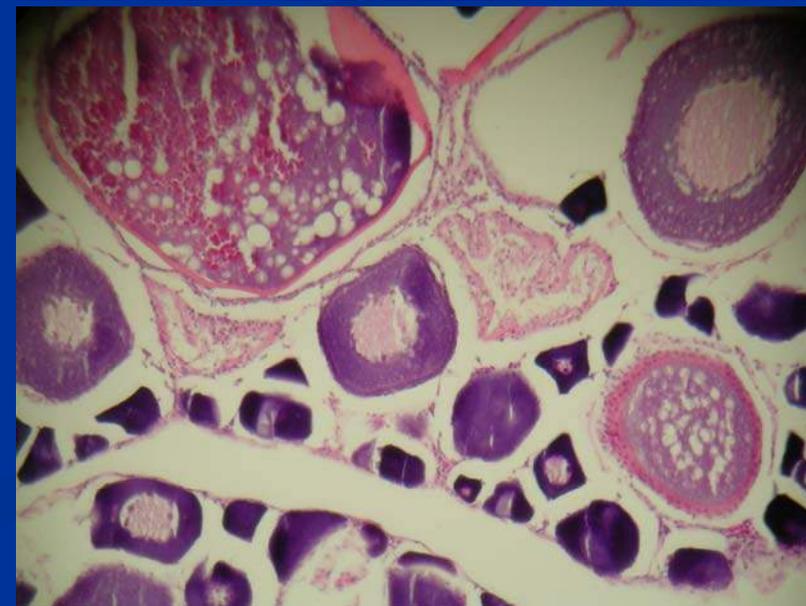
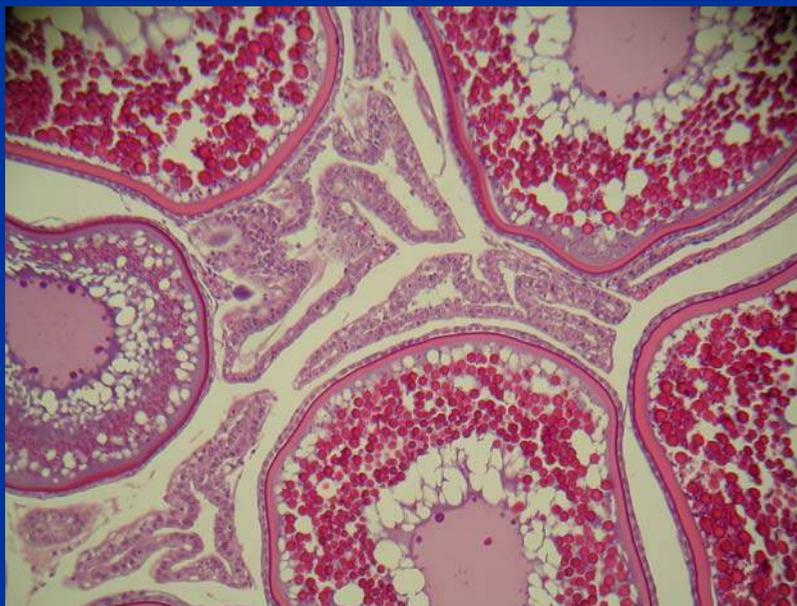
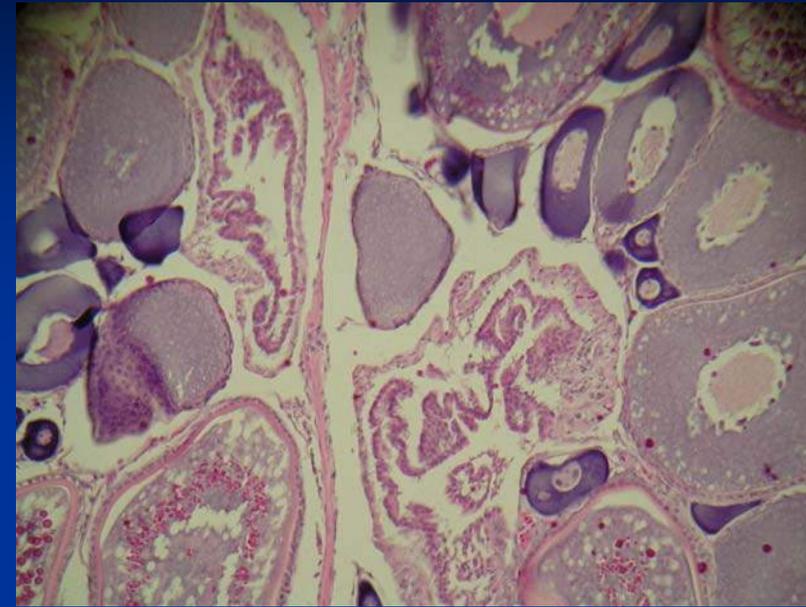
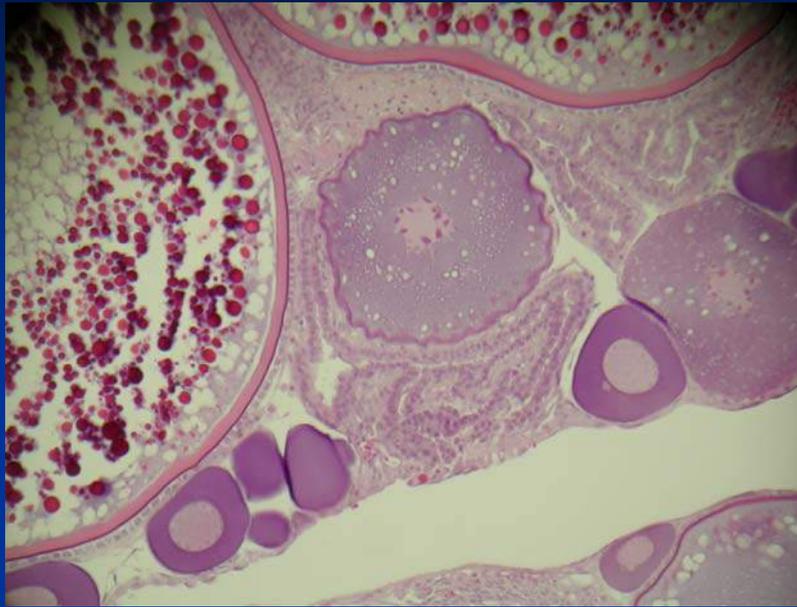
# Daily spawning fraction

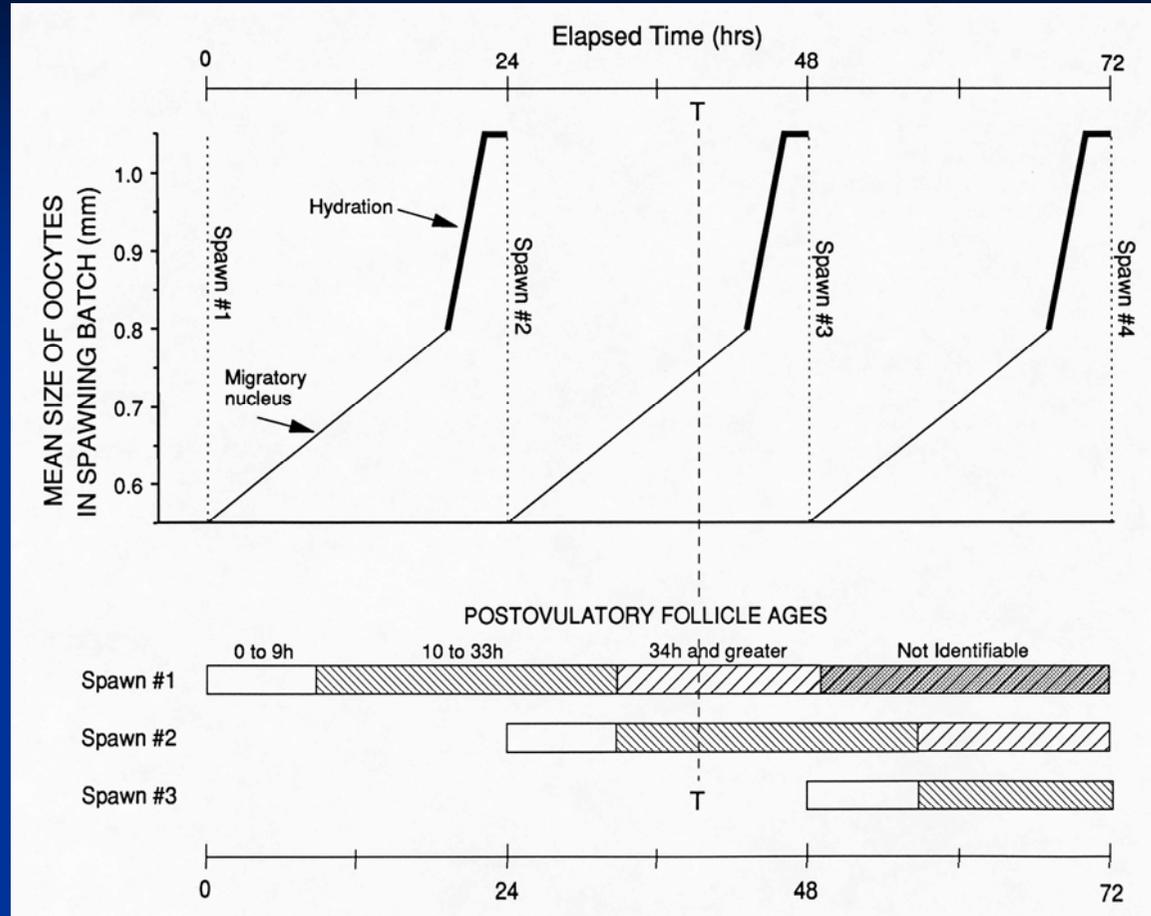
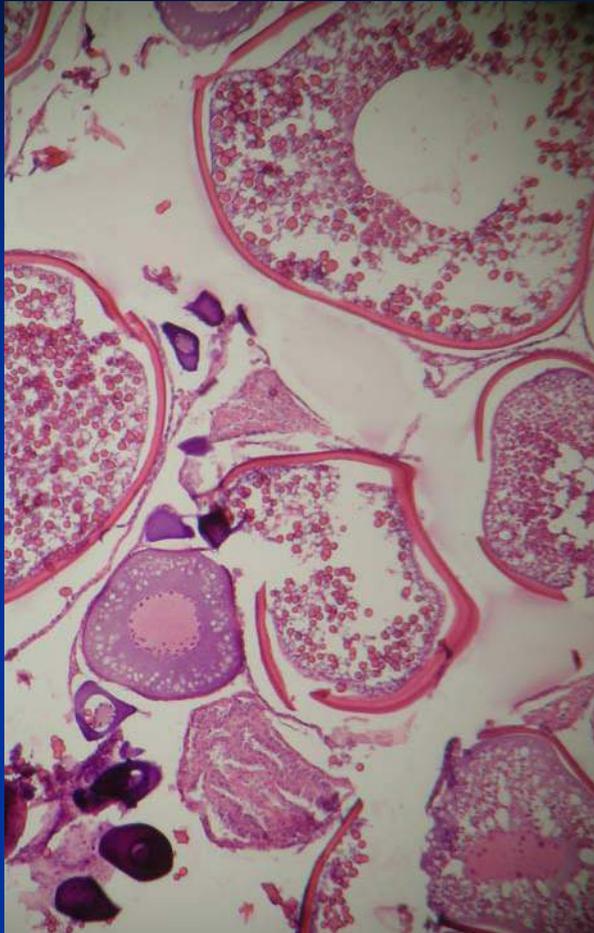
- Identify degenerating stages of postovulatory follicles
- Water temperature
- Know peak hour of spawning
- Sampling time
- Pick 24 hour time periods  
(not the 24h clock-day)

# Postovulatory follicles

7-9 °C Pacific hake

Skipjack tuna 24 °C





Conceptual diagram showing when various histological stages could be identified in an ovary of a *S. japonicus* female that spawned every night.

# Atresia must be identified

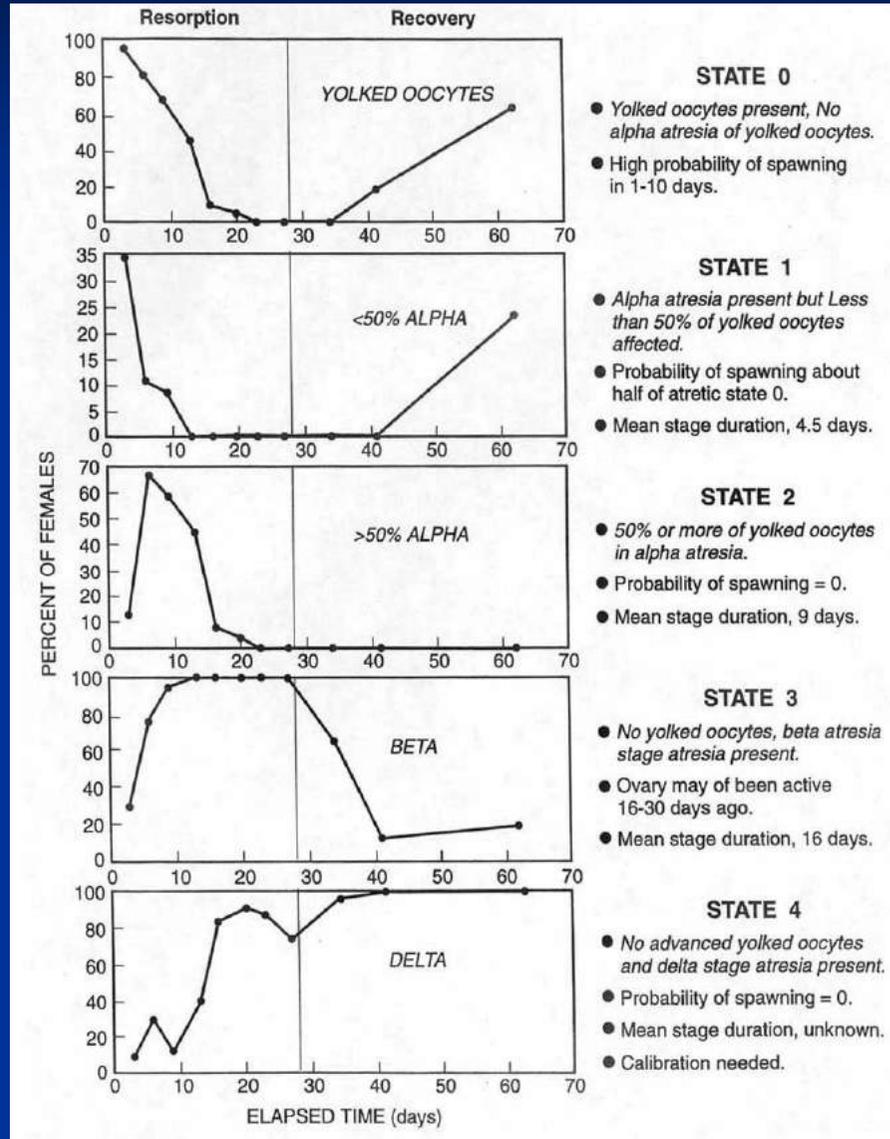
(degeneration and absorption of an oocyte and its follicle)

- to ensure POF are identified and aged correctly
- to separate postspawning mature females with regressed ovaries from immature females
- a key histological marker for the cessation of spawning (high prevalence of high intensity)

# Northern anchovy (*Engraulis mordax*)

Experiment began on mature females with ovaries containing yolked oocytes

## Atretic criteria during ovary resorption and recovery



# Female Maturity

Ovarian activation (oocyte development) is critically important but it is not equivalent to sexual maturity (except 1<sup>st</sup> time)

- Histological criteria should include atresia stages and postovulatory follicles
- Sampling should occur in the spawning season when matures are less likely to be confused (many have active ovaries)

Table 2. Ovarian criteria for each code and indication of female maturity.

Code	Oocyte class			Atresia					Spawn <sup>a</sup> soon or recent	♀ Maturity <sup>b</sup>	
	no yolk	early yolk	ad- vance yolk	δ	α no yolk	α early yolk	β	α adv. yolk		anytime absolute I and M	within season + other <sup>c</sup>
101	+									I	I
102	+			-	+					U	I or M
103	+			-	-		+			U	M
104	+			-	+		+			U	M
105	-	+		-	-					U	I or M
106	-	+		-	-	+				U	I or M
107	-	+		-	-	-	+			U	M
108	-	-	+	-	-	-	-	+ ≥ 50%		M	M
109	-	-	+	-	-	-	-	+ ≥ 50%	+	M	M
110	-	+		-	-	+	+		+	M	M
111	-	+		-	-		-		+	M	M
112	-	-	+	-	-	-	-			M	M
113	-	-	+	-	-	-	-	+ <50%		M	M
114	-	-	+	-	-	-	-		+	M	M
115	-	-	+	-	-	-	-	+ <50%	+	M	M

**blank** = not present; - = may be present; + = must be present

<sup>a</sup> spawn = presence of hydrated oocytes or recent POF, degeneration <70 hours after spawning)

<sup>b</sup> female: I = immature, U = uncertain (add criteria or other information to determine), M = mature

<sup>c</sup> other data used during season: β atresia indicate mature; ovaries of immatures (some may have begun developing) have no δ atresia and thin-medium ovary walls, while ovaries of previous mature females have δ and thick walls in these classes, hence 102, 105, 106 will be split.

# Daily Egg Production Method (DEPM)

update

Pacific Sardine (*Sardinops sagax*)

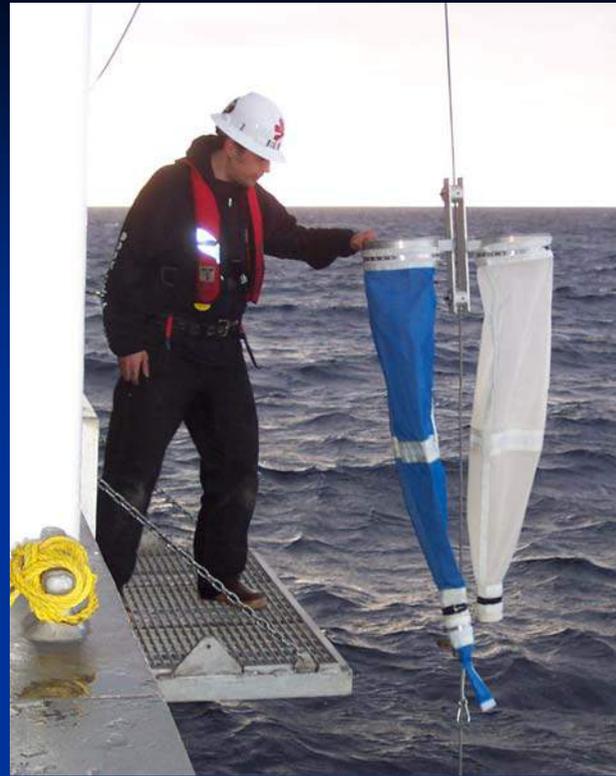
**In the DEPM,**

$$B_s = P_0 A / (R/W_f) S F$$

where  $B_s$  is biomass, for area  $A$ ,

- \*  $P_0$  is the daily egg production at age 0 day per unit sea surface area,  
 $W_f$  is the average female weight,  
 $S$  is the fraction of females spawning per day,  
 $F$  is batch fecundity  
 $R$  is the fraction of the biomass that is female  
and
- \*  $(R/W_f) S F$ , is number of eggs/biomass in grams and is also called the daily specific fecundity.

Bongo



Paironet



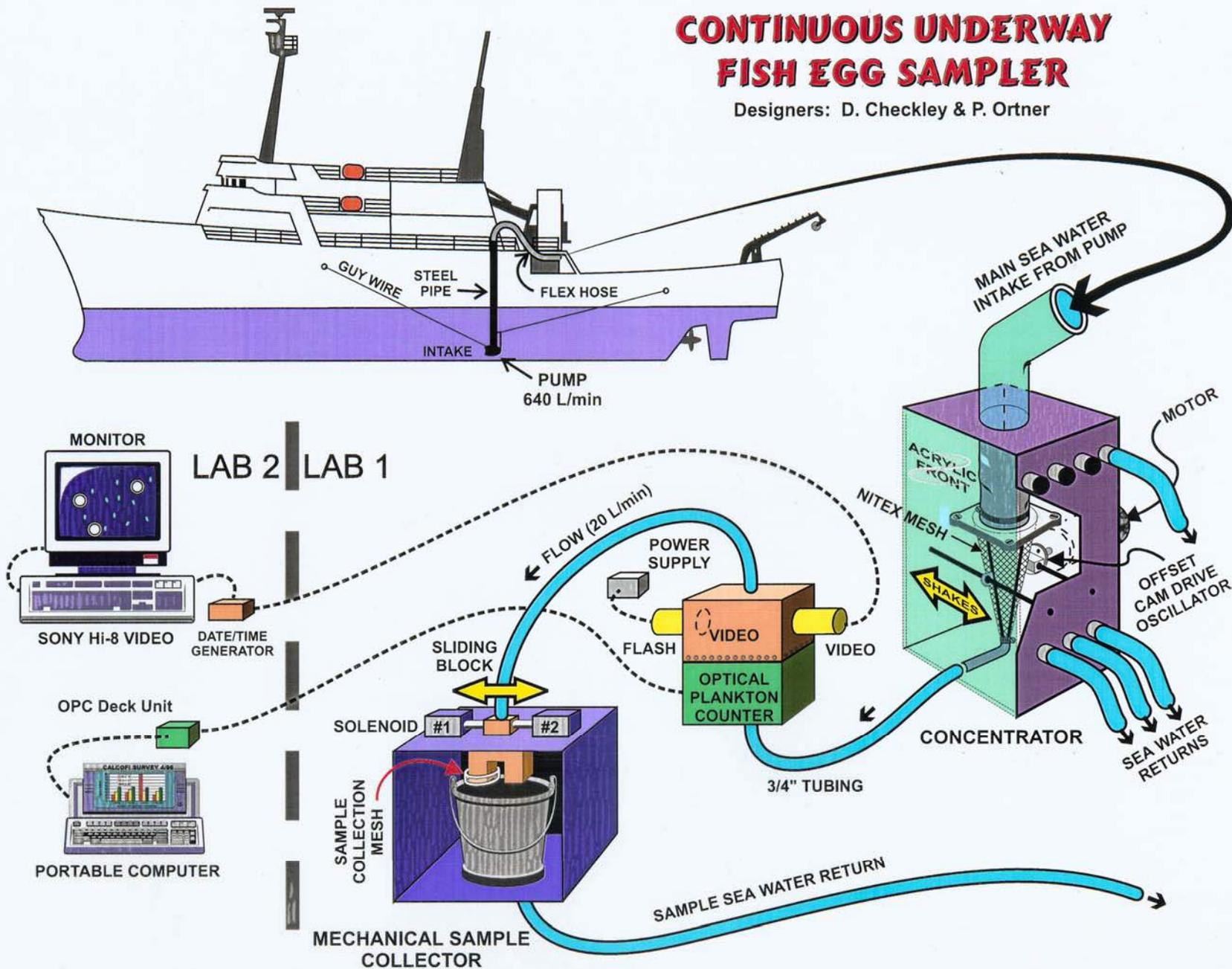
CTD

Manta

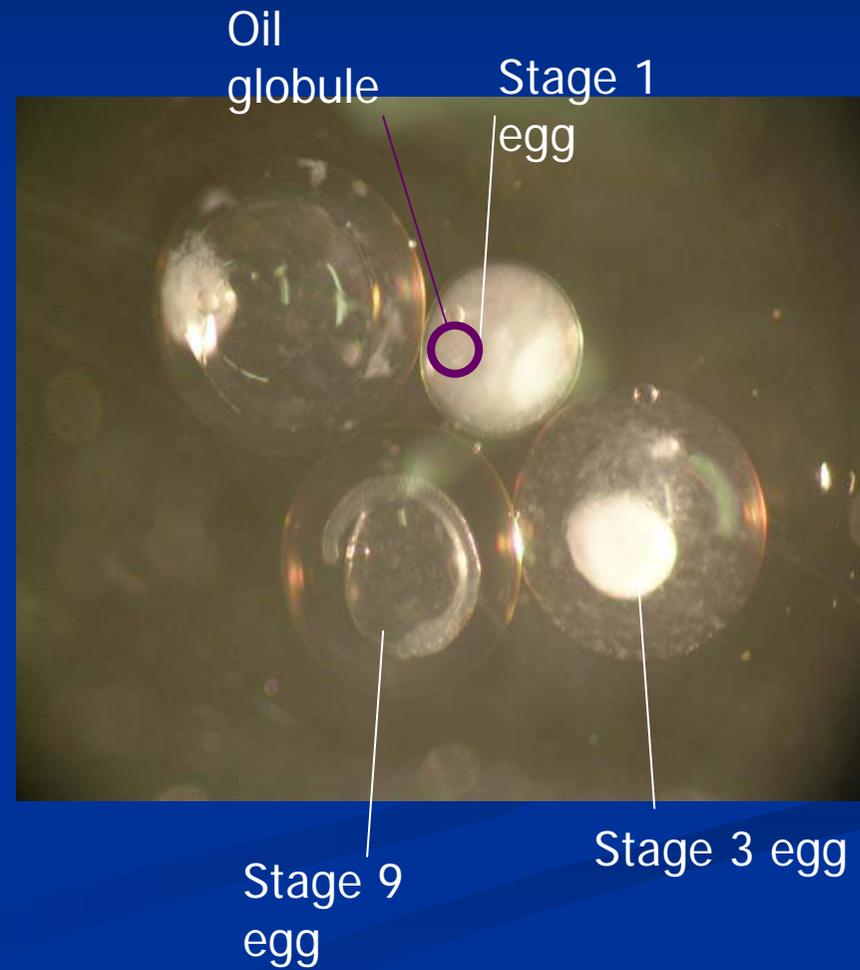
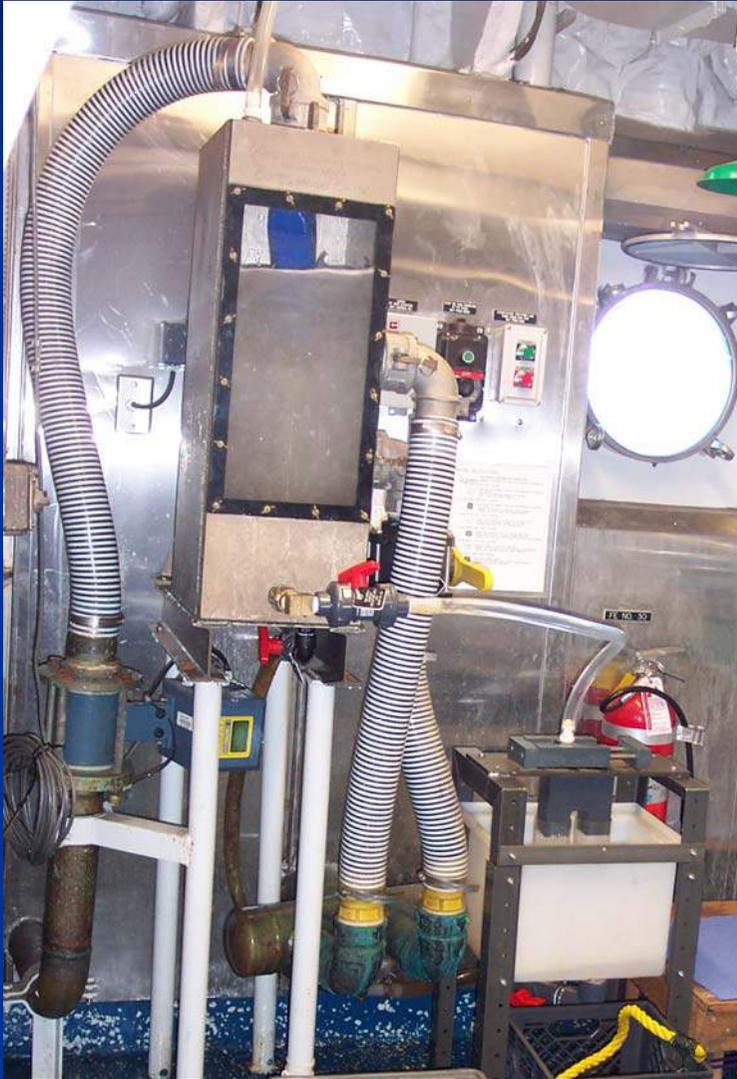


# CONTINUOUS UNDERWAY FISH EGG SAMPLER

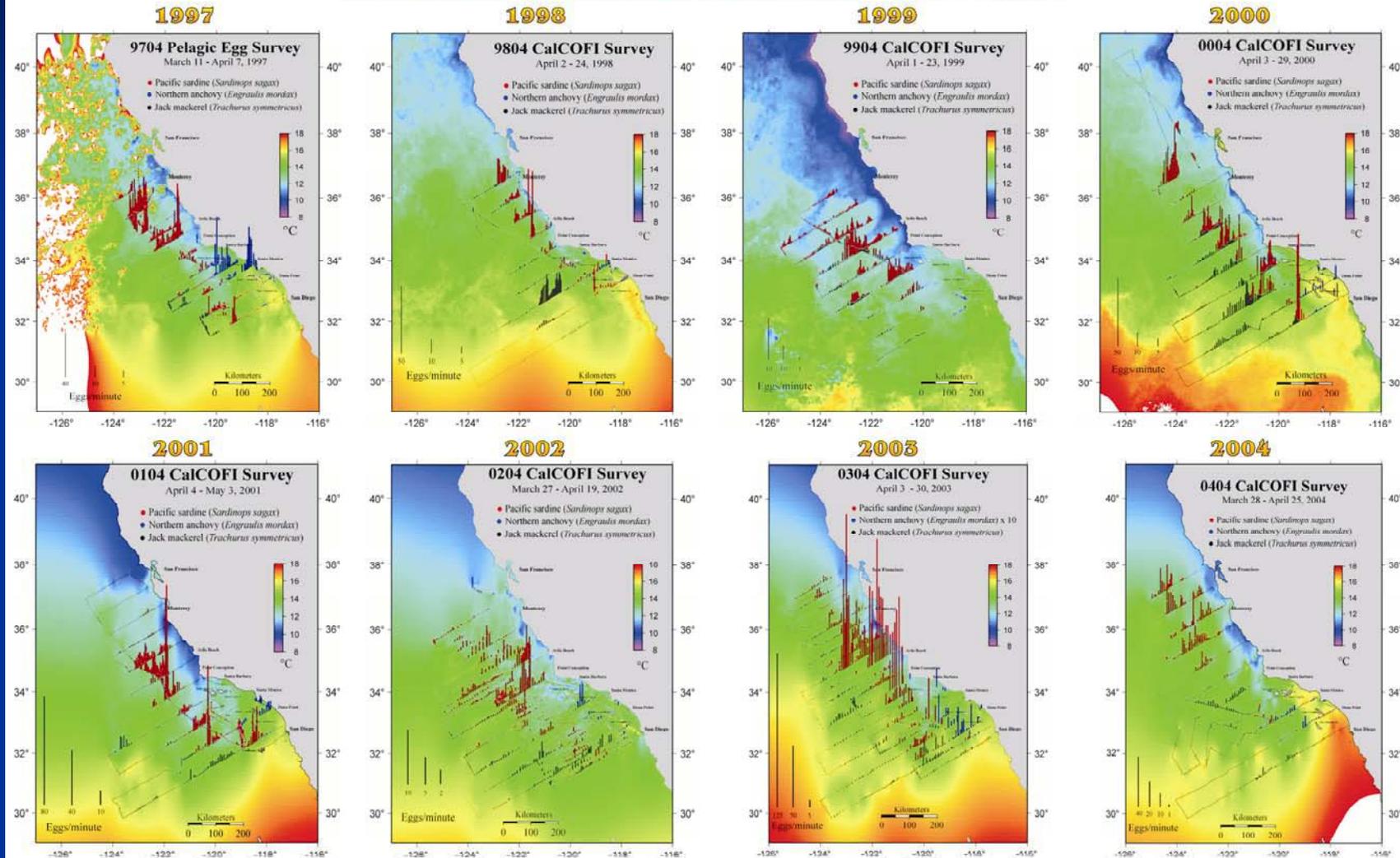
Designers: D. Checkley & P. Ortner



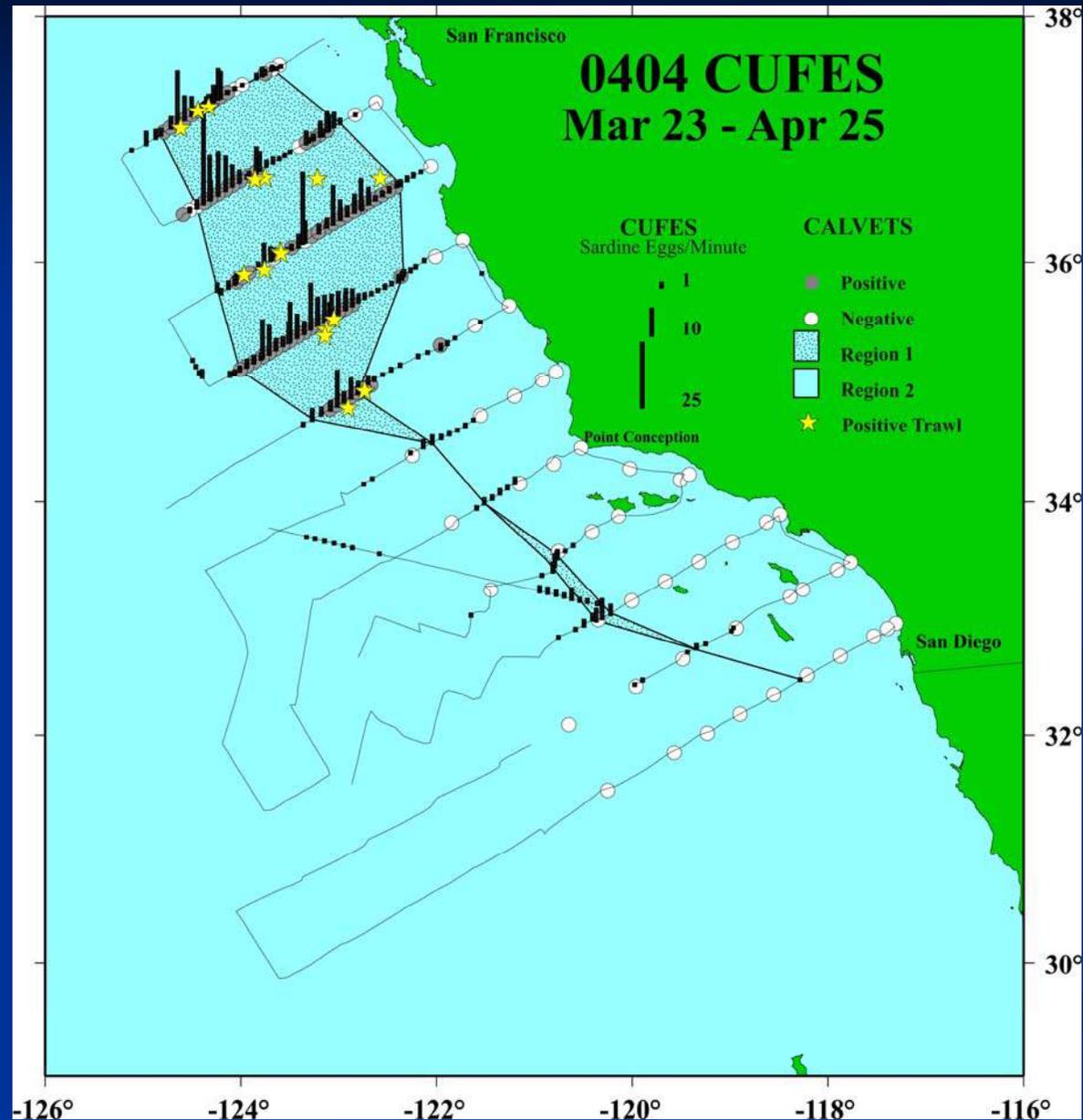
# CUFES and a sample with sardine eggs

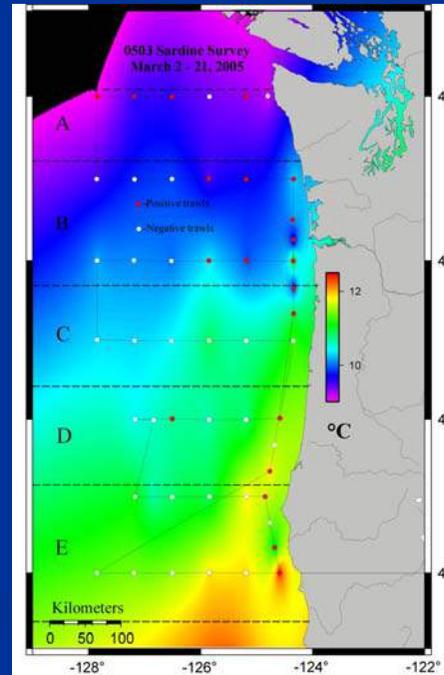
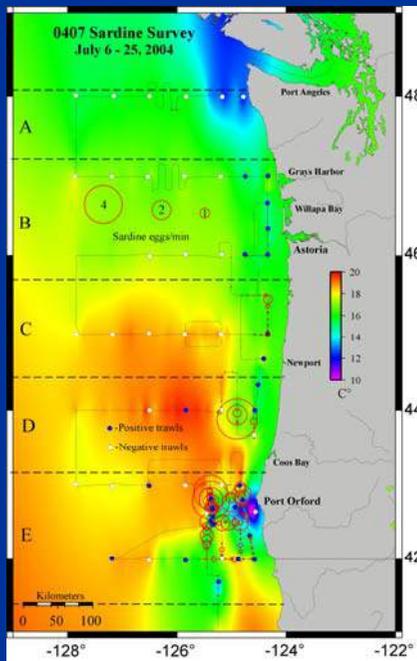
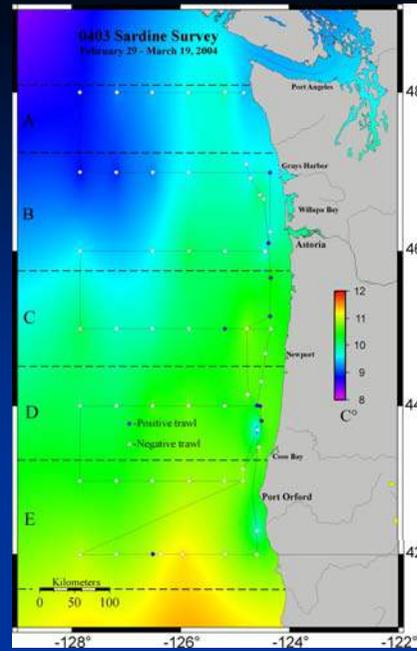
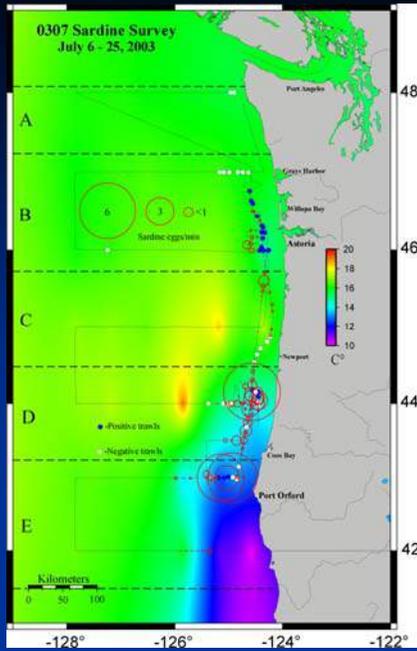


# SPATIAL DISTRIBUTION OF EGG DENSITY PACIFIC SARDINE, NORTHERN ANCHOVY AND JACK MACKEREL WITH SEA SURFACE TEMPERATURE - 1997 - 2004



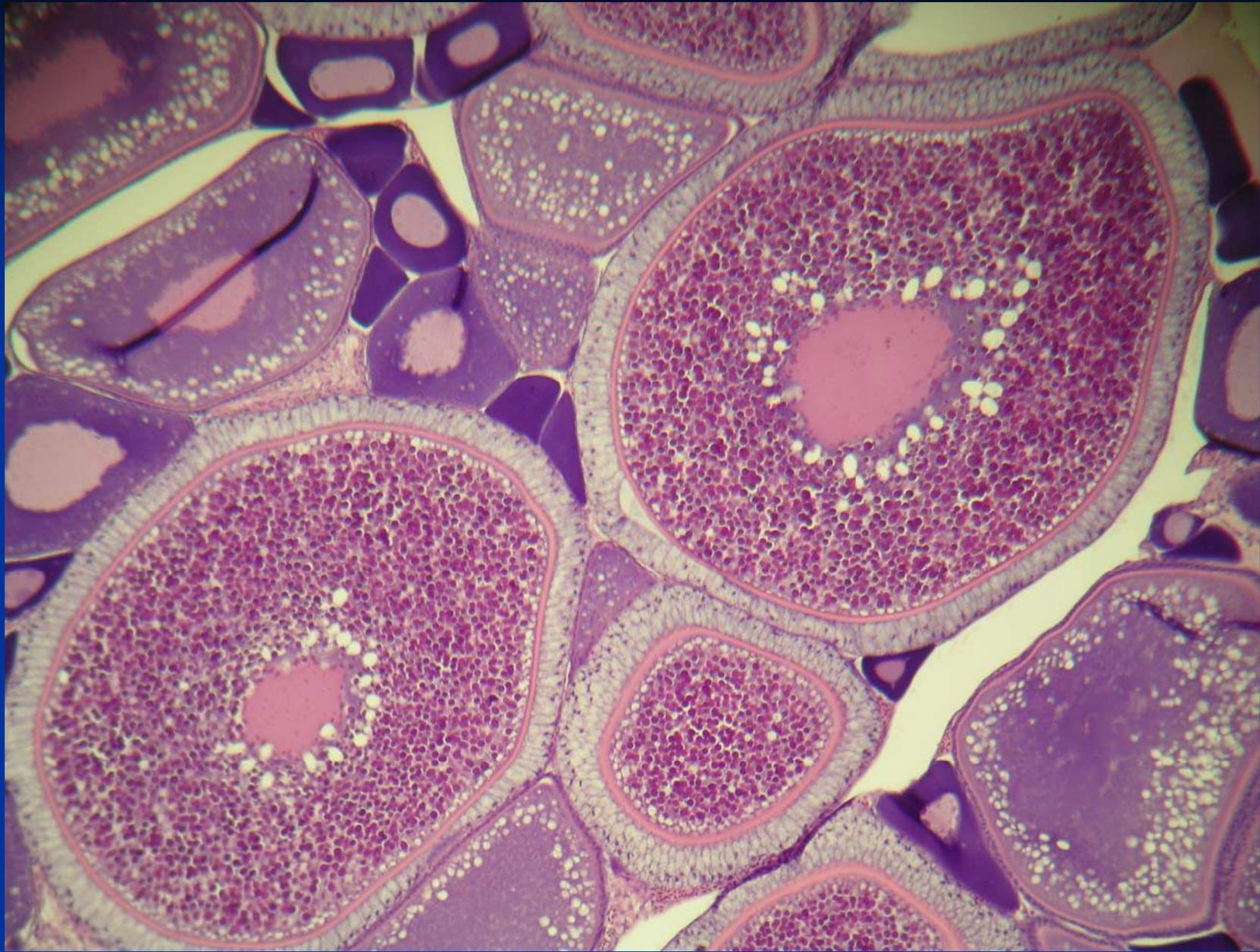
# In 2004 trawling based on high density of sardine eggs and available ship days

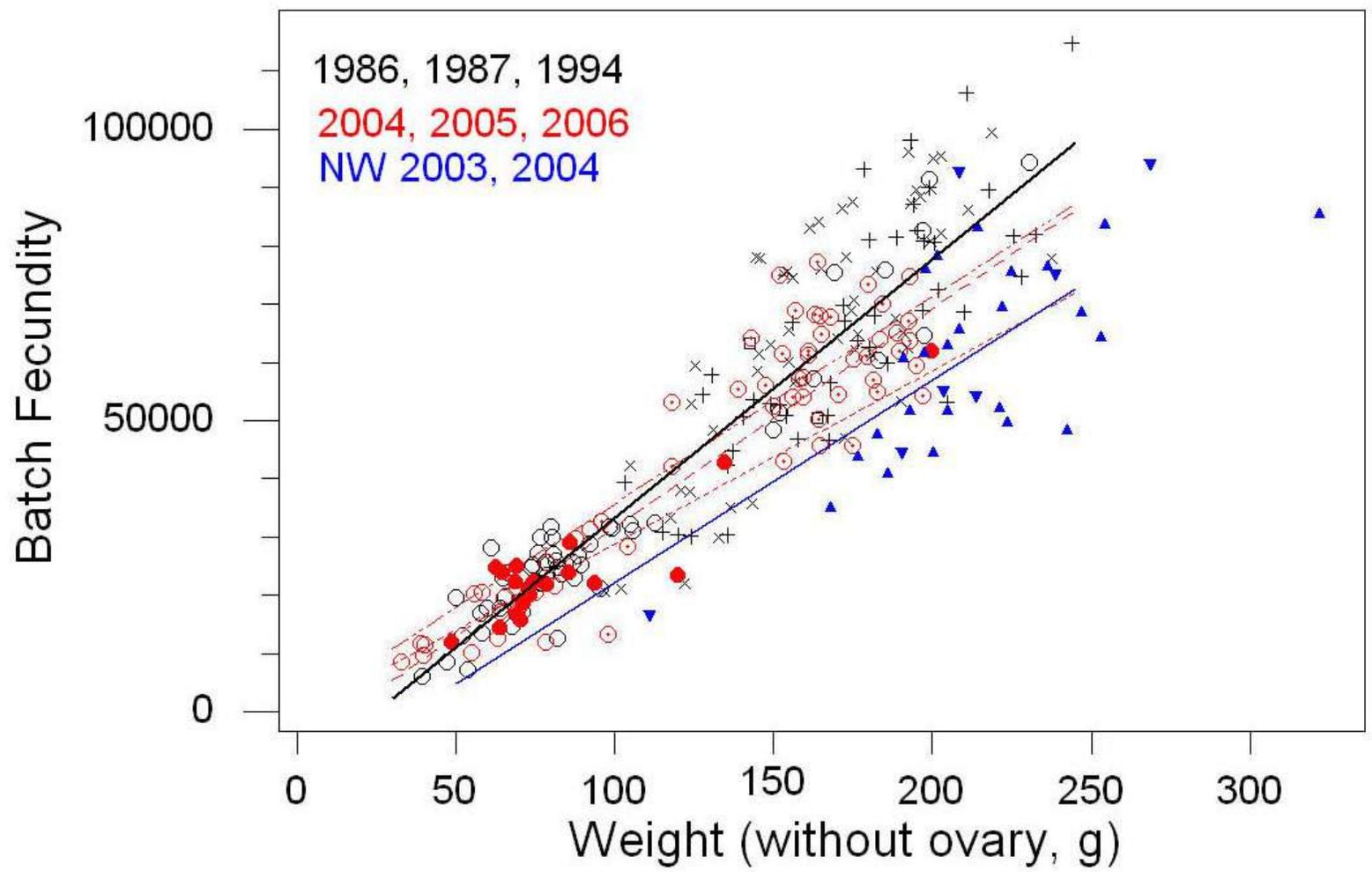






Sardines were measured, sexed, ovaries preserved, and otoliths removed for aging





# Adult sardine reproductive parameters

		1994	1997	2001	2002	2004	2005	2006
Midpoint date of survey		April 22	March 25	May 1	April 21	April 24	April 13	April 25
Number of collections with mature females		37	4	2	6	16	14	7
Average surface temperature (°C) at collection locations		14.36	14.28	12.95	12.75	13.59	14.18	14.43
Female fraction by weight	R	0.538	0.592	0.677	0.385	0.618	0.469	0.451
Average mature female weight (grams): with ovary	W	82.53	127.76	79.08	159.25	166.99	65.34	67.41
without ovary	W <sub>of</sub>	79.33	119.64	75.17	147.86	156.29	63.11	64.32
Average batch fecundity (all mature females, eggs estimated)	F	24283	42002	22456	54403	55711	17662	18152
Relative batch fecundity (eggs/g)	F/W	294	329	284	342	334	270	269
Number of mature females analyzed		583	77	9	23	290	175	86
Spawning fraction of mature females	S	0.074	0.133	0.111	0.174	0.131	0.124	0.069
Spawning fraction of active females	S <sub>a</sub>	0.131	0.133	0.111	0.174	0.131	0.178	0.089
Daily specific fecundity (if sex ratio = 0.5)	$\frac{RSF}{W}$	11.7 ( )	25.9 (21.86)	21.3 (15.75)	22.91 (27.20)	27.04 (21.78)	15.67 (16.76)	8.47 (9.29)

Table 2. Ovarian criteria for each code and indication of female maturity.

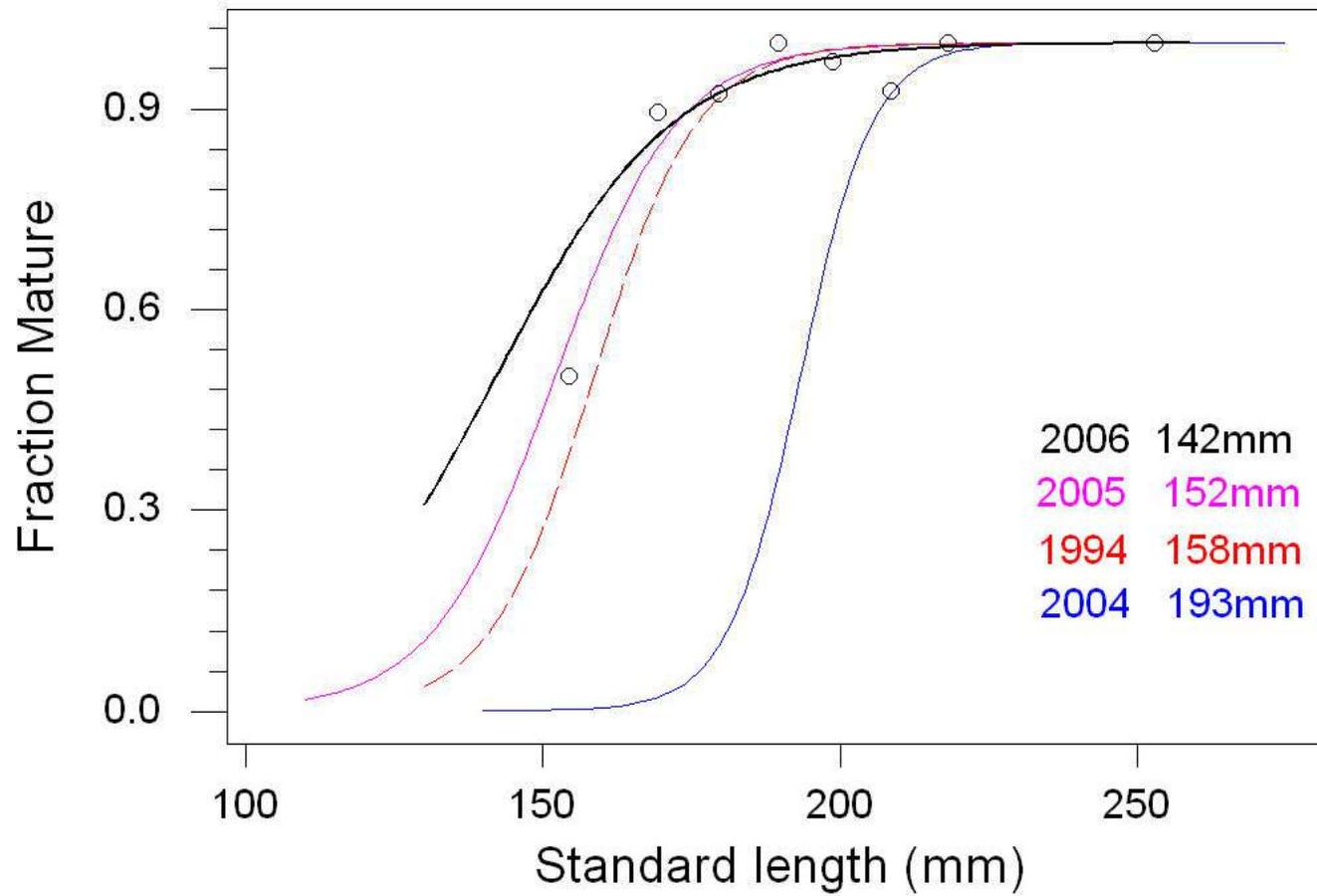
Code	Oocyte class			Atresia					Spawn <sup>a</sup> soon or recent	♀ Maturity <sup>b</sup>	
	no yolk	early yolk	ad- vance yolk	δ	α no yolk	α early yolk	β	α adv. yolk		anytime absolute I and M	within season + other <sup>c</sup>
101	+									I	I
102	+			-	+					U	I or M
103	+			-	-		+			U	M
104	+			-	+		+			U	M
105	-	+		-	-					U	I or M
106	-	+		-	-	+				U	I or M
107	-	+		-	-	-	+			U	M
108	-	-	+	-	-	-	-	+ ≥ 50%		M	M
109	-	-	+	-	-	-	-	+ ≥ 50%	+	M	M
110	-	+		-	-	+	+		+	M	M
111	-	+		-	-		-		+	M	M
112	-	-	+	-	-	-	-			M	M
113	-	-	+	-	-	-	-	+ <50%		M	M
114	-	-	+	-	-	-	-		+	M	M
115	-	-	+	-	-	-	-	+ <50%	+	M	M

**blank** = not present; - = may be present; + = must be present

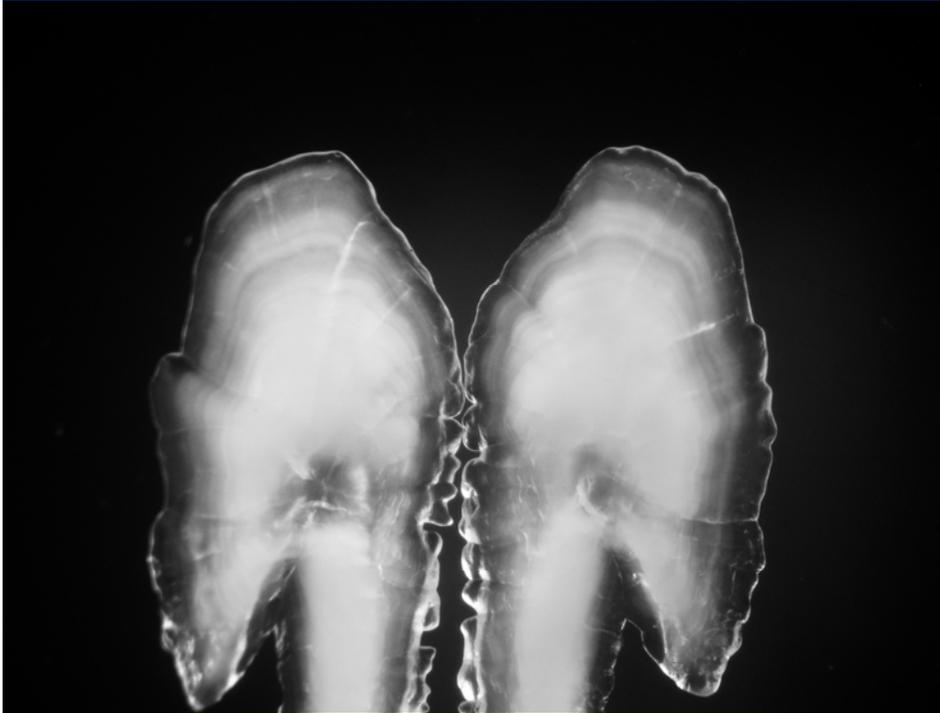
<sup>a</sup> spawn = presence of hydrated oocytes or recent POF, degeneration <70 hours after spawning)

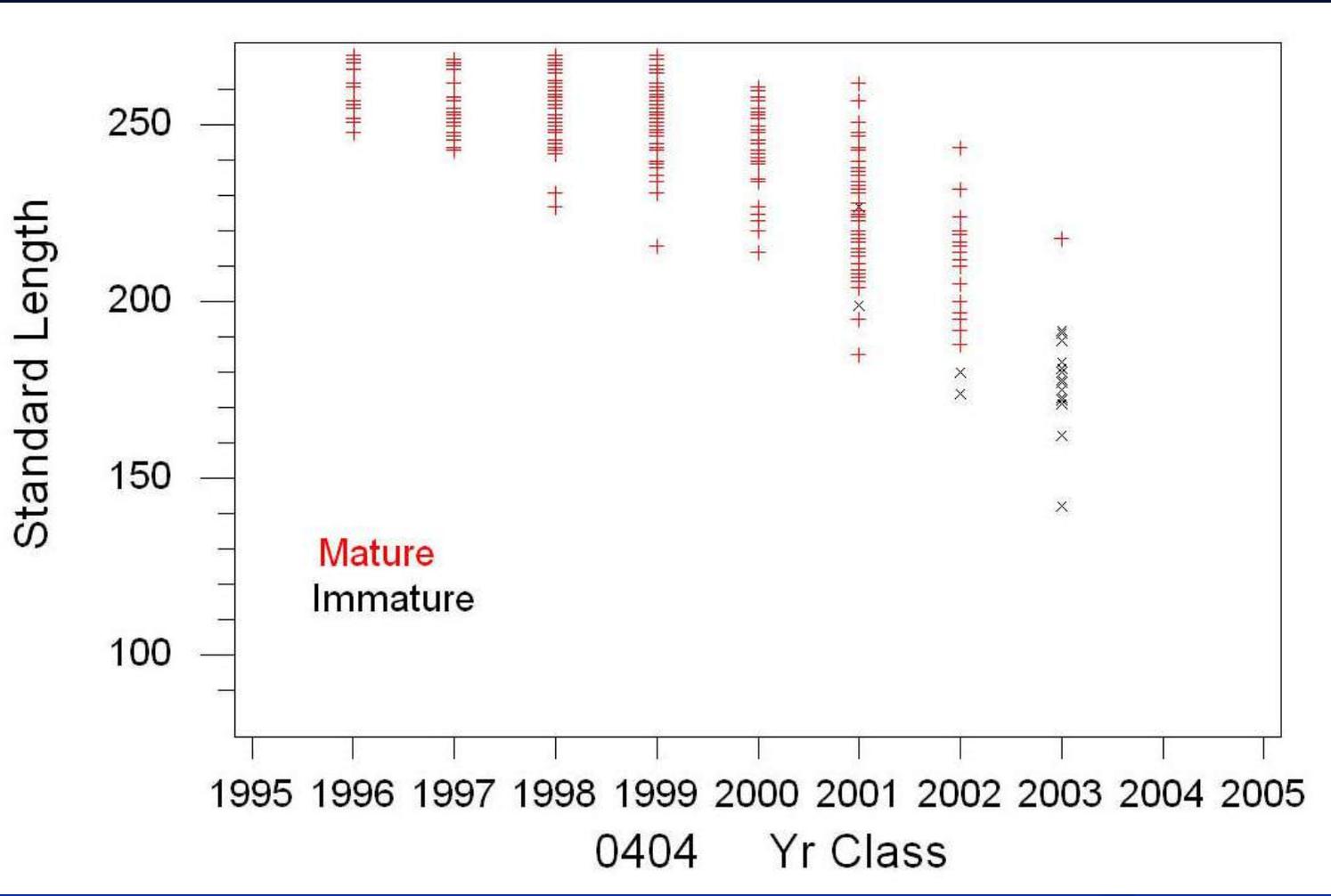
<sup>b</sup> female: I = immature, U = uncertain (add criteria or other information to determine), M = mature

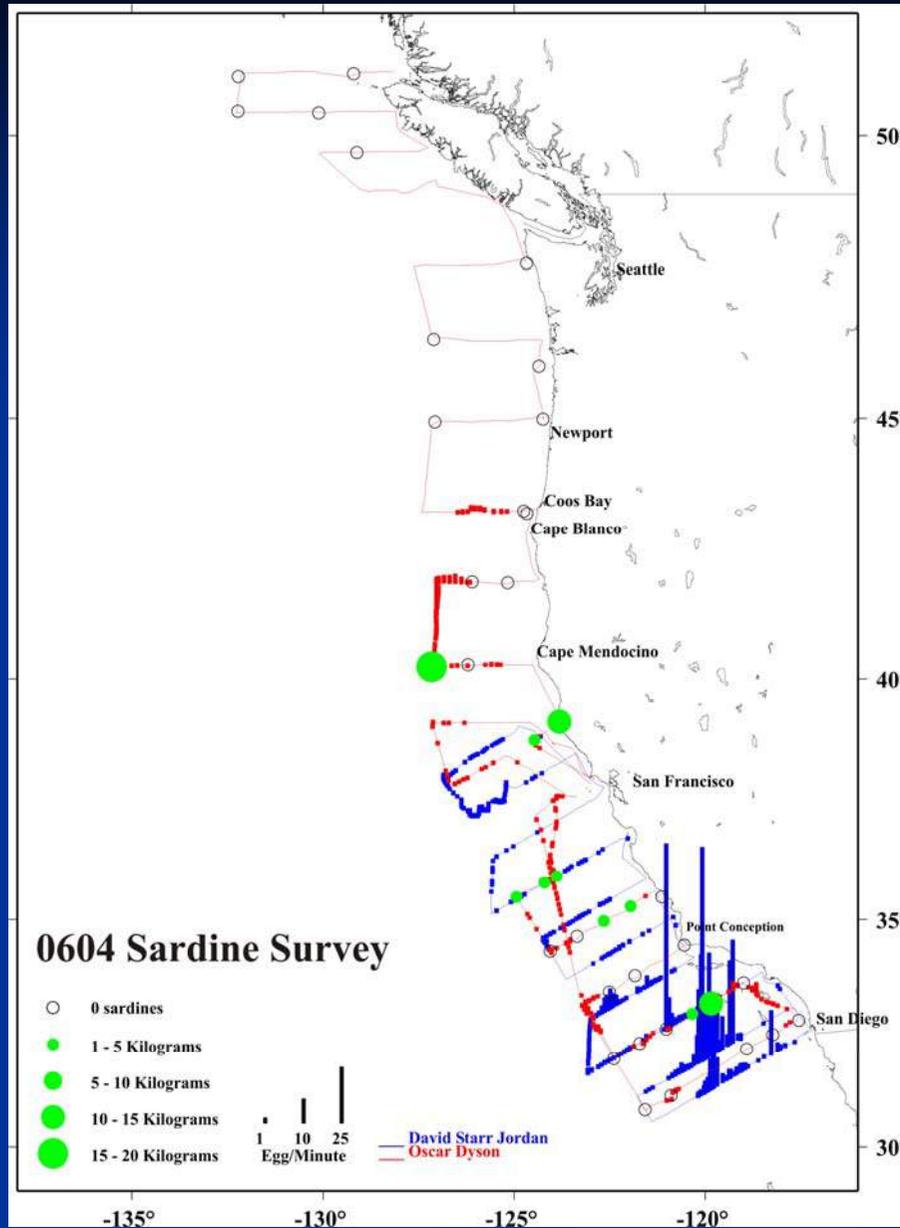
<sup>c</sup> other data used during season: β atresia indicate mature; ovaries of immatures (some may have begun developing) have no δ atresia and thin-medium ovary walls, while ovaries of previous mature females have δ and thick walls in these classes, hence 102, 105, 106 will be split.

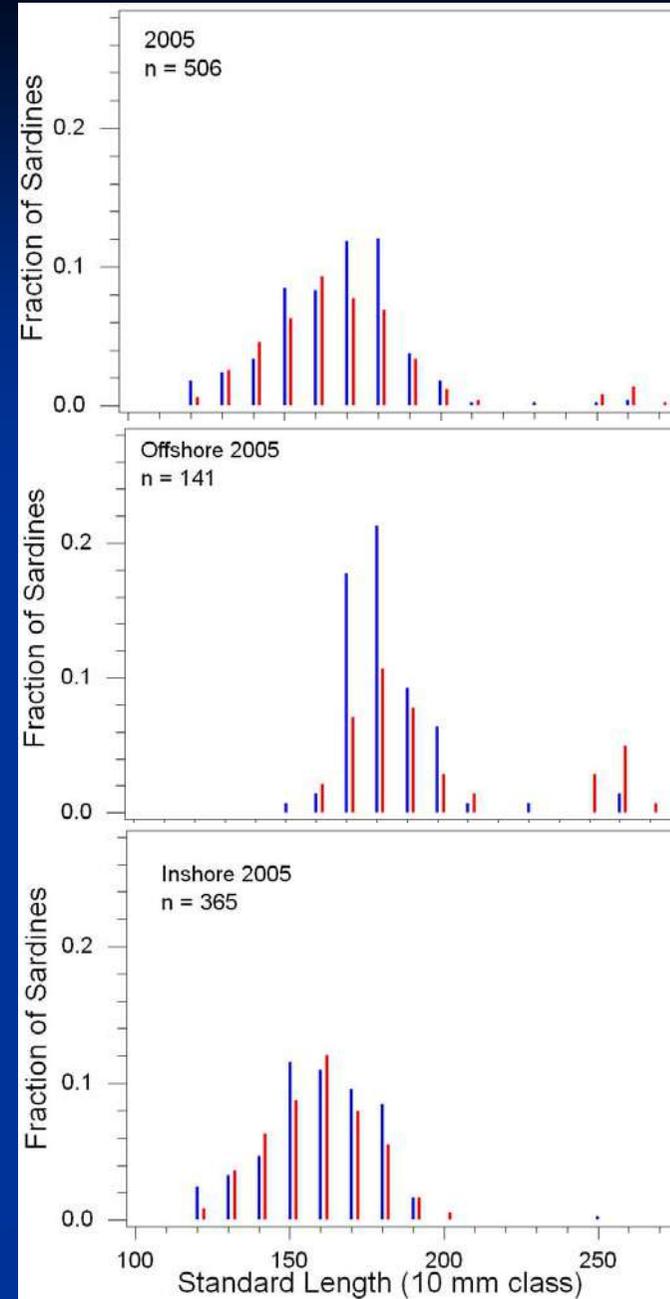
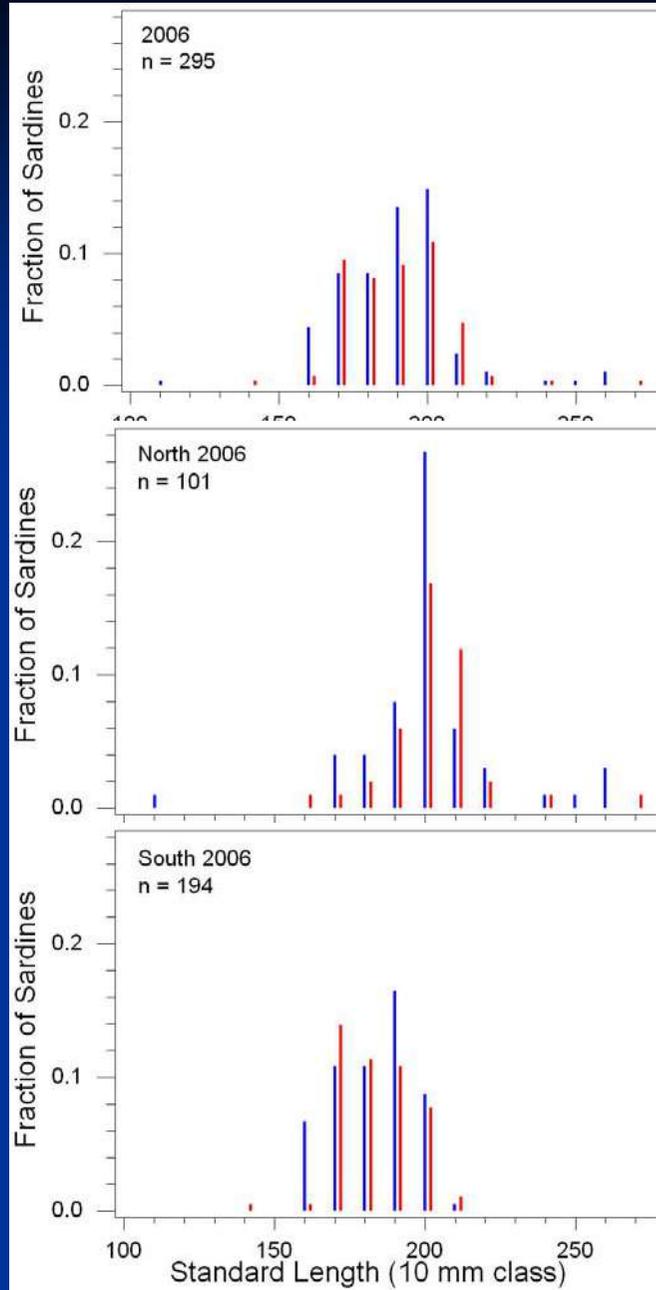


# Sardine Otoliths



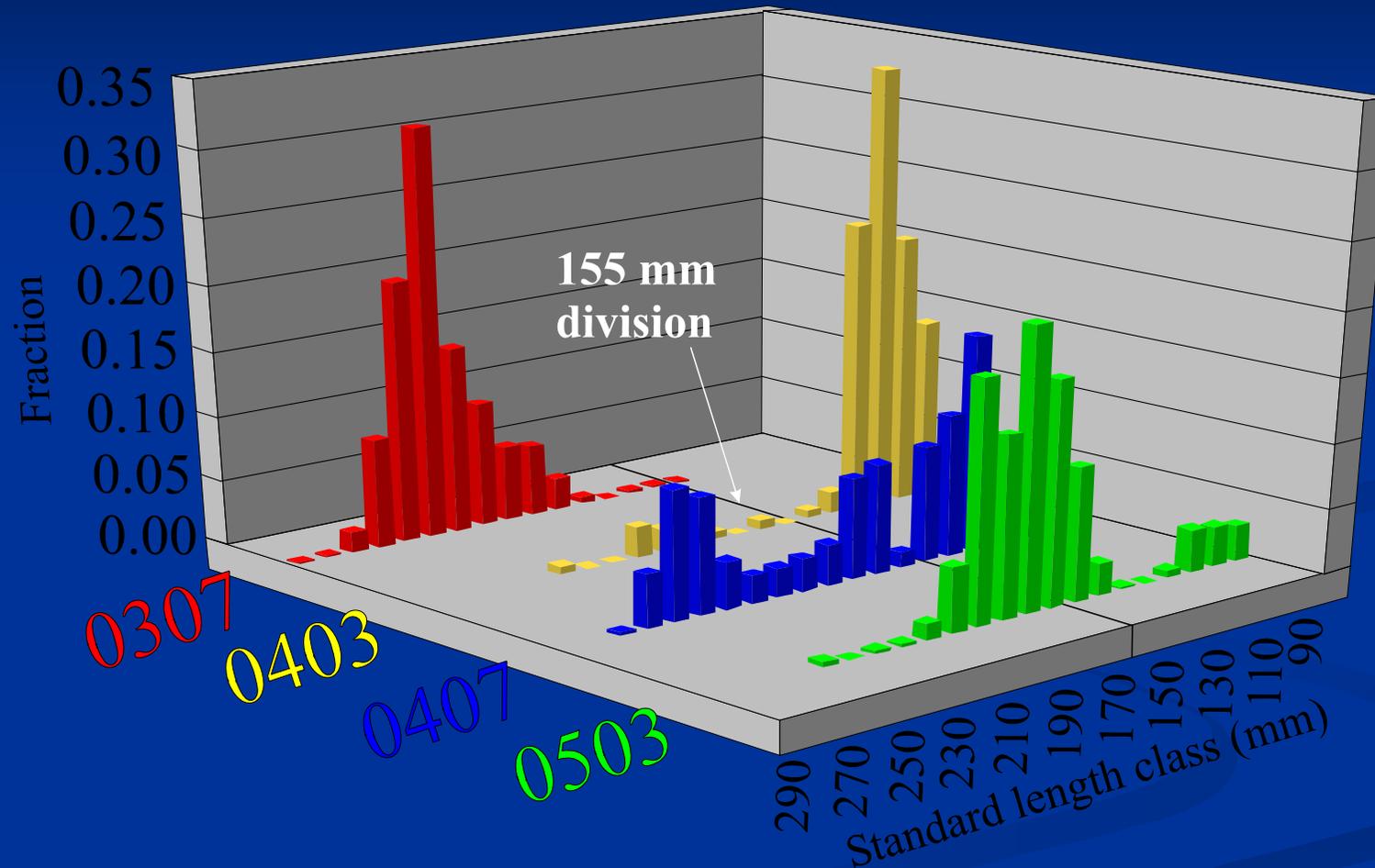






— male  
— female

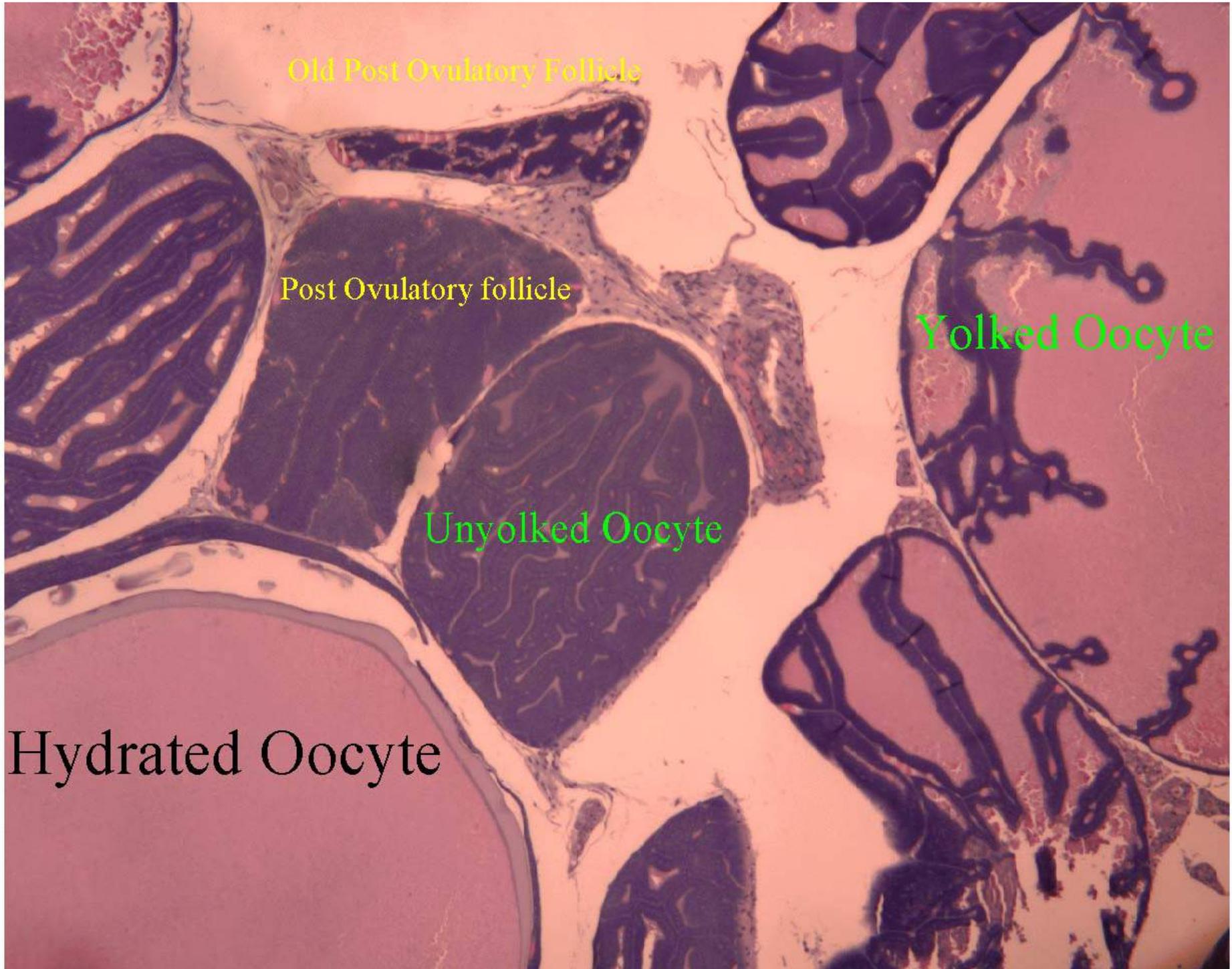
# Sardine standard length distribution by survey



random samples of males, females, and indeterminate sex

# Market squid

*Loligo opalescens*



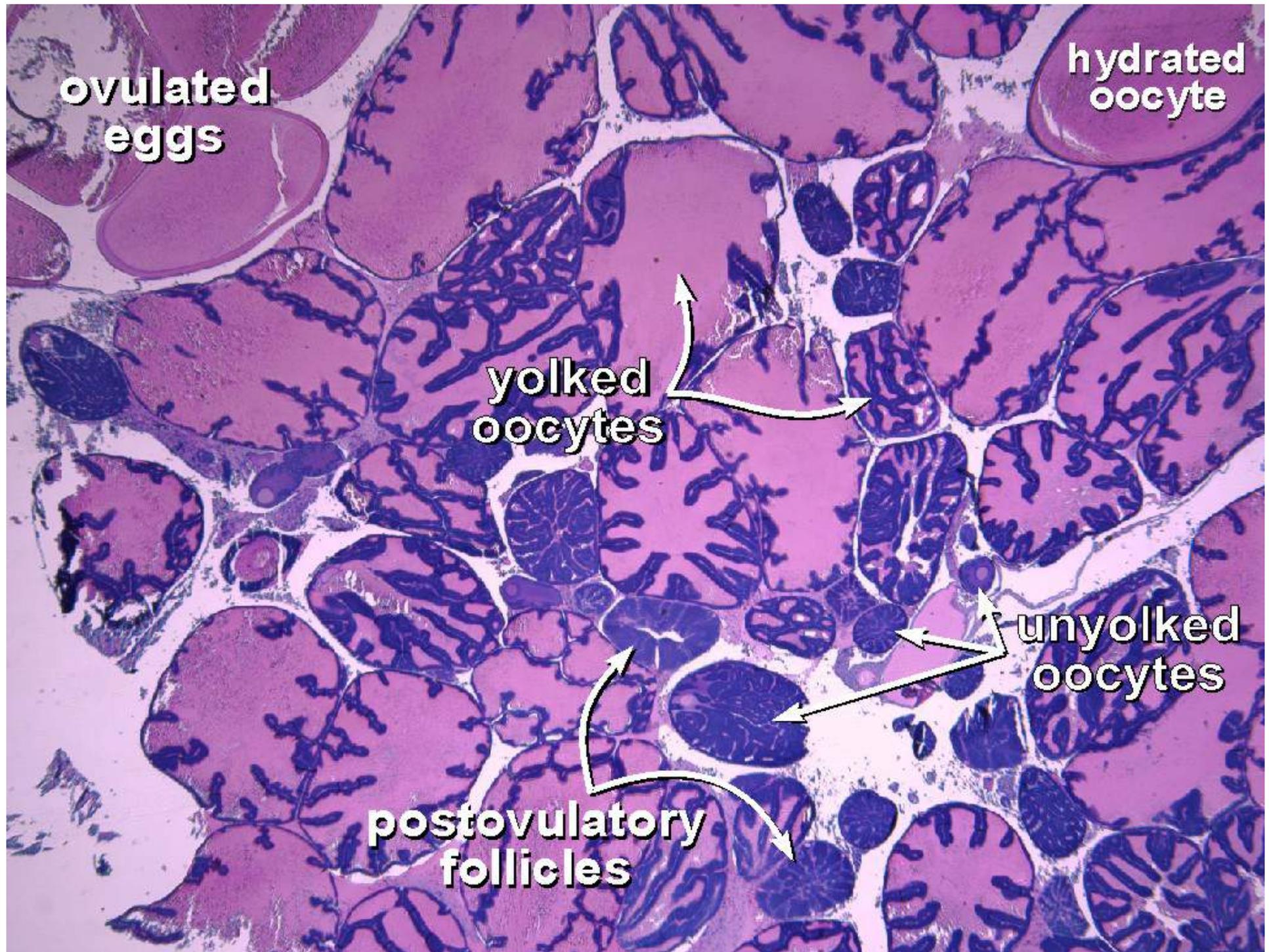
Old Post Ovulatory Follicle

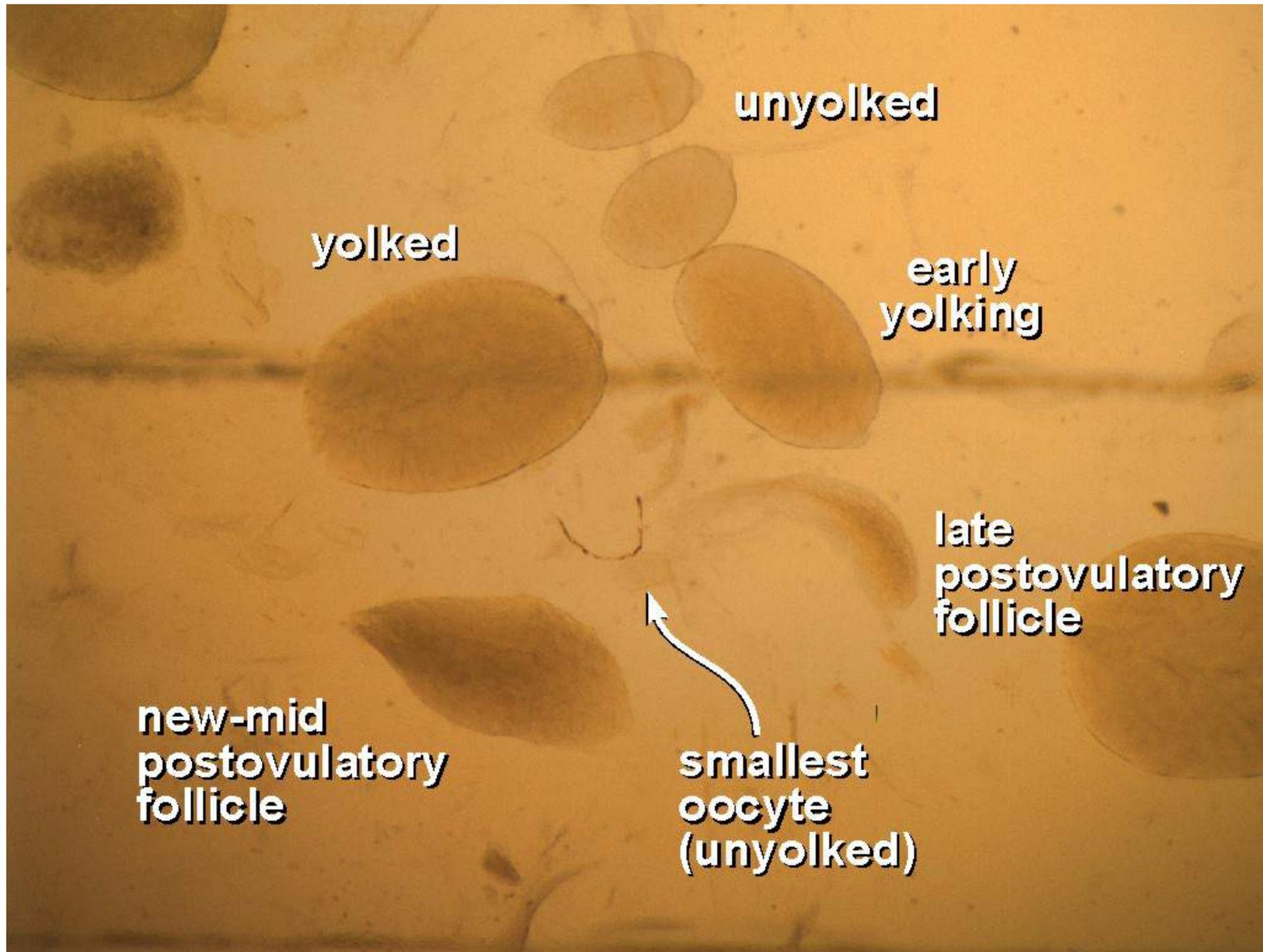
Post Ovulatory follicle

Unyolked Oocyte

Yolked Oocyte

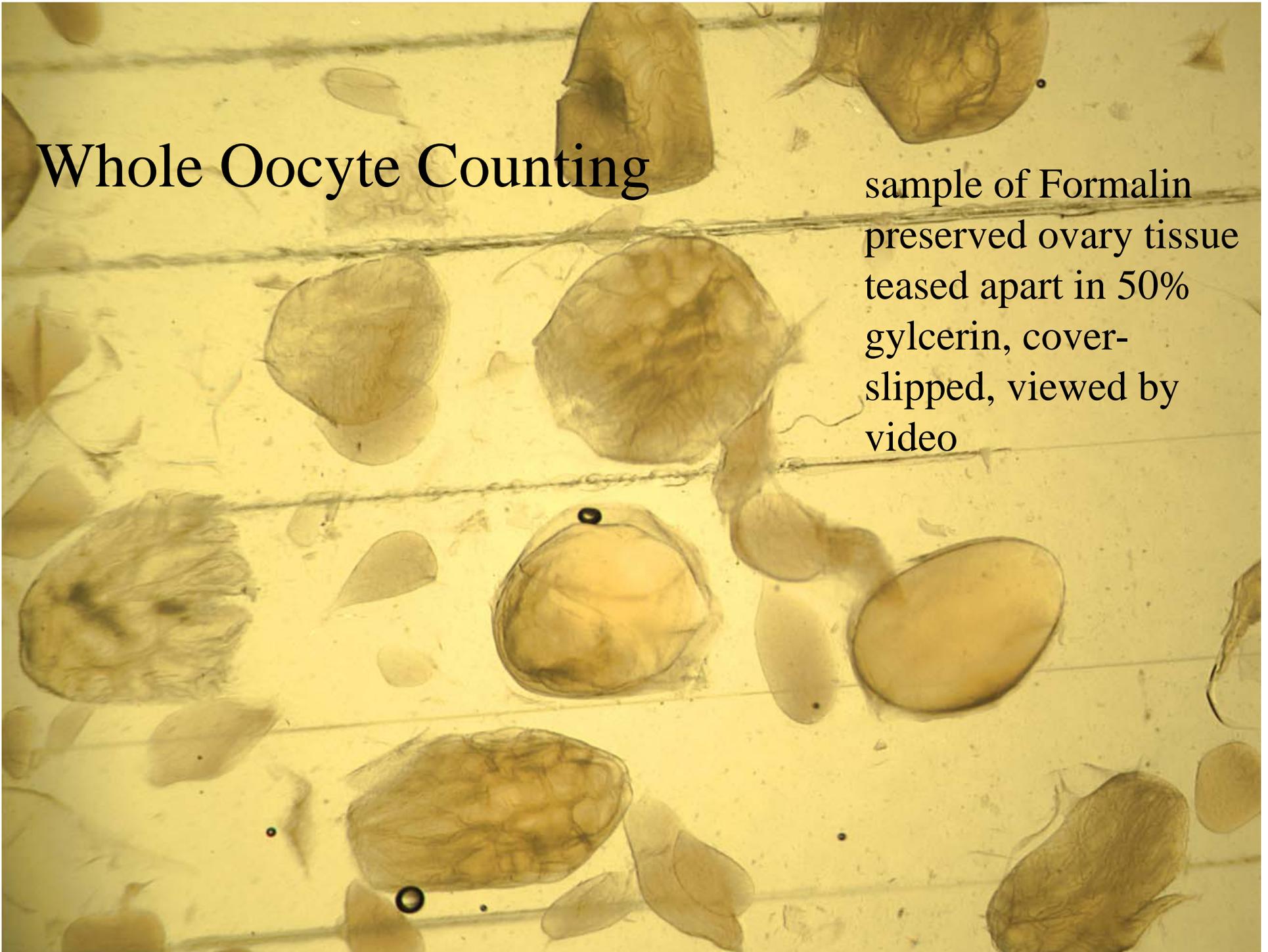
Hydrated Oocyte



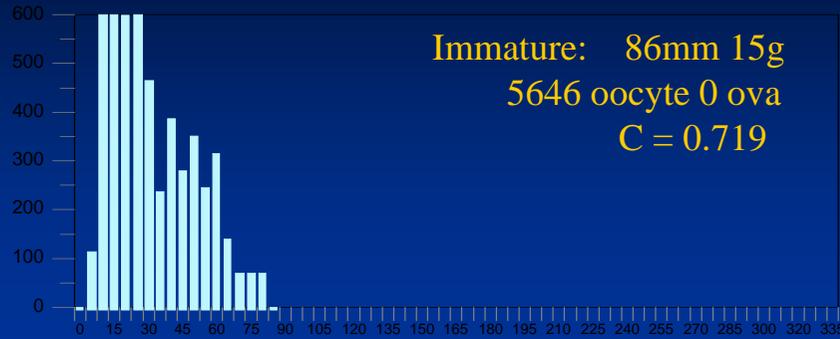


# Whole Oocyte Counting

sample of Formalin  
preserved ovary tissue  
teased apart in 50%  
glycerin, cover-  
slipped, viewed by  
video



# Oocyte Size Distribution



Oocyte Major Axis Diameter (mm)

# *Engraulis mordax* data sheet developed for recording identified, histological ovarian characteristics

FISH NUMBER		OOCYTE CLASS				SPAWNING STATE					α ATRESIA				B ATRESIA	CORPORA ATRETICA	
		UNYOLKED	PARTIAL YOLKED + UNYOLKED	FEW YOLKED + REST	FULL YOLKED + REST	HYDRATED EGGS	HYDRATED EGGS + DAY-0 PO	DAY-0 PO	DAY-1 PO	≥ DAY-2 PO	UNYOLKED	PARTIAL YOLKED	<50% YOLKED	≥50% YOLKED		Y	δ
		(1)	(2)	(3)	(4)	(01)	(21)	(20)	(30)	(40)	(1)	(1)	(1)	(2)	(1)	(1)	(1)

Used for other species with modifications due to differences



**IPIMAR**

**Av. de Brasília • 1449 - 006 Lisboa • Portugal  
Tel: 213 027 000 Fax: 213 015 948**