**EFEITOS DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NOS PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEOMA DO SÊMEN DE *Lutjanus synagris* (ARIACÓ).**

**Mayra Bezerra Vettorazzi1\*; Rossi Lelis Souza Muniz1; Fabio Roger Vasconcelos2; Jorge André Matias Martins3; Celso Shiniti Nagano4; Arlindo Alencar Moura2; Manuel Antônio de Andrade Furtado-Neto1,4.**

1Instituto de Ciências Marinhas Tropicais, Universidade Federal do Ceará \*mayra.vettorazzi@hotmail.com; 2Laboratório de Fisiologia Animal, Universidade Federal do Ceará; 3Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade de Serra Talhada; 4Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará.

**RESUMO**

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) melhora a desova em peixes vermelhos, especialmente se considerado a produção e qualidade de ovos e a taxa de eclosão. O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros seminais e o proteoma do sêmen de ariacó submetidos à terapia hormonal com hCG. As proteínas foram analisadas por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida SDS-PAGE combinada com identificação por espectrometria de massas ESI-Q-TOF. Esta é a primeira análise do proteoma do sêmen de ariacó, e detectou 32 tipos de banda, com um total de 71 proteínas identificadas. O hCG aumentou a concentração espermática, o número de espermatozoides morfologicamente normais, a concentração de proteínas solúveis e cinco diferentes bandas no sêmen de ariacó. *PSP-I, HSP90AA1, ubiquitin carboxi-terminal hydrolase 5 e transferrin* foram diferencialmente expressas no sêmen de peixes tratados com hCG. As proteínas seminais que foram diferencialmente expressas após o tratamento com hCG estão envolvidas potencialmente na proteção espermática. Estas descobertas abrem caminhos para que novas pesquisas incrementem ainda mais as tecnologias de cultivo de peixes, técnicas de reprodução assistida e preservação de gametas.

**Palavras-chave:** proteoma, eletroforese, morfologia espermática, peixe, plasma seminal, hCG

**ABSTRAT**

Human chorionic gonadotropin (hCG) improve spawnings in snappers, especially regarding production, egg quality and hatching rates. The aim of the present study was to evaluate seminal parameters and proteome of lane snapper subjected to hCG hormonal therapy. Proteins were separated by one-dimensional electrophoresis SDS-PAGE combined with mass spectrometry identification ESI-Q-TOF. This is the first evaluation of lane snapper semen proteome and has detected 32 types of bands and identified 71 different proteins. hCG improved sperm concentration , morphologically normal sperm, soluble proteins concentration and five different bands in lane snapper semen. *PSP-I, HSP90AA1, ubiquitin carboxi-terminal hydrolase 5 and transferrin* were differentially expressed in hCG-treated fish semen. These proteins are potentially envolved with sperm protection. These discoveries open ways to new researches improve fish farming technologies as well as assisted reproduction and gametes preservation.

**Key words:** proteome, electrophoresis, sperm morphology, fish, seminal plasma, hCG

1. **INTRODUÇÃO**

# A piscicultura marinha sustentável depende do controle da reprodução e da aquisição de gametas de qualidade, dentre outros fatores (Mylonas et al., 2009; Nielsen et al., 2017). Entretanto, a ocorrência de disfunções reprodutivas é bastante comum em peixes cultivados (Guzmán et al., 2015; Zupa et al., 2017). Não raro, em fêmeas reprodutoras a maturação final dos ovócitos e desova são comprometidas e os machos produzem reduzido volume de sêmen e/ou espermatozoides de baixa qualidade. Estas disfunções são relativas às condições de cultivo que nem sempre são fiéis ao habitat natural, causando uma falha na liberação de hormônio luteinizante pela hipófise (Zohar and Mylonas, 2001). Para prevenir essas disfunções reprodutivas tem-se utilizado diversos tratamentos hormonais. Diferentes tipos de agonistas de hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRHa) têm sido testados em muitas espécies (Weil and Crim, 1983; Sorbera et al., 1996; Mañanos et al., 2002; Vermeirssen et al., 2003), sendo a gonadotrofina coriônica humana (hCG) a gonadotrofina mais comumente utilizada devido à sua disponibilidade, alto grau de pureza e atividade padronizada (Lee et al., 1988). O tratamento com hCG em *Solea senegalensis* desencadeia altas taxas de secreção de 11-ketotestosterona em comparação com protocolos de GnRHa (Guzmán et al., 2011). Isto se dá basicamente porque o GnRHa age na hipófise estimulando a secreção de gonadotrofinas endógenas, enquanto o hCG age diretamente na gônada estimulando a esteroidogênese. O efeito do hCG não é dependente da ativação da hipófise nem do estoque existente de gonadotrofinas desta glândula.

# O ariacó (*Lutjanus synagris*) é uma espécie importante comercialmente no Atlântico ocidental. O Brasil tem, nos últimos anos, aumentado as exportações desta espécie para a América do Norte (Caltabellotta et al., 2016). Esta alta demanda comercial, combinada ao declínio nas populações selvagens de vermelhos têm estimulado o interesse no cultivo destas espécies (Riley et al., 2004). Neste cenário, o ariacó aparece como excelente candidato para a aquicultura (Vettorazzi et al., 2010). Inúmeros estudos têm mostrado que o hCG melhora a desova nos vermelhos quando comparados com outras técnicas hormonais, especialmente baseados na produção e qualidades de ovócitos e no sucesso de eclosão de ovos (Souza et al., 2016, Minton et al., 1983, Cabrera et al., 1998; Emata, 2003; Dumas et al., 2004; Boza-Abarca et al., 2008; Ibarra-Castro and Alvarez-Lajonchere, 2011; Souza et al., 2016). Além disso, o uso de terapias hormonais facilita a desova e minimiza custos com infraestrutura e pessoal nas larviculturas (Phelps et al., 2009).

# Em mamíferos o sêmen é principalmente composto de espermatozoides e plasma seminal. Muitas pesquisas têm se voltado para revelar a composição proteica deste fluido. As proteínas seminais modulam diversos aspectos funcionais do espermatozoide, incluindo a capacitação, reação acrossômica, proteção, remodelamento de membrana, motilidade e fertilização. O proteoma do espermatozoide também tem sido objeto de pesquisa principalmente para identificação de marcadores moleculares de fertilidade em homens, touros, carneiros, ratos e cães. Em contraste com os conhecimentos fundamentais já disponíveis para proteoma de plasma seminal e de espermatozoide em mamíferos, pouco se sabe sobre o proteoma de espermatozoide de peixes. Com estudos pioneiros, Nynca et al. (2014a,b) e Dietrich et al. (2014a,b) descreveram o proteoma de espermatozoides plasma seminal de truta arco-íris e carpa, respectivamente. Em ambos os estudos os autores descreveram grupos de proteínas presentes no espermatozoide e plasma seminal, incluindo aquelas comuns às duas espécies, como *transferrin*, *apolipoprotein*, *tubulin* e *creatine-kinase*. A descrição da composição e função das proteínas do espermatozoide possibilita a compreensão dos mecanismos moleculares da fertilização e abre caminhos para o desenvolvimento de pacotes tecnológicos de reprodução artificial e criopreservação de germoplasma (Li et al., 2009; Cabrita et al., 2014). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros espermáticos e o proteoma do sêmen de ariacós submetidos à terapia hormonal com hCG.

# 2- MATERIAL E MÉTODOS

Ariacós adultos foram capturados por linha e anzol aproximadamente 15 mi da costa de Fortaleza (3º43’06’’S latitude e 38º32’34’’W longitude), Ceará, Brasil e mantidos sob condições de cultivo (27°C, 35 ‰ salinidade) no Centro de Estudos Ambientais Costeiros (CEAC), do Instituto de Ciências Marinhas (LABOMAR), Universidade Federal do Ceará (UFC). Durante o período do experimento os animais permaneceram em tanques de 10 mil L, com recirculação de água e foram alimentados duas vezes ao dia *ad libtum*. O alimento ofertado continha 50% de ração comercial, 30% de sardinha, 10% de lula e 10% de camarão. Os peixes foram submetidos à anestesia com banho de imersão em eugenol (4%) antes de qualquer manejo de acordo com a metodologia já reportada para a espécie (Souza et al., 2015).

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo A com 12 machos (245,02 ± 20,14 g) e não receberam tratamento hormonal (controle); grupo B com 11 machos (264,75 ± 22,48 g), receberam uma única dose de 500 UI hCG/kg peso corpóreo (Chorulon; Intervet do Brasil Veterinária, Ltda, Brazil; Souza et al., 2016). A dose de hCG foi aplicada aos animais por injeções intraperitoneais e o sêmen foi coletado 24 horas depois da injeção de hormônio como previamente descrito por Souza et al. (2016).

As amostras de sêmen foram coletadas de todos os animais através de massagem abdominal (Vettorazzi, et al., 2010). As amostras foram coletadas com pipetas de 200 µL e transferidas para microtubos de 1,5 mL. Imediatamente após a coleta, uma alíquota de sêmen foi retirada para a avaliação da porcentagem de espermatozoides móveis. Outra alíquota de sêmen foi diluída em formol salino (4%) para a determinação da concentração espermática (1:4000, sêmen:formol salino), usando câmara de Neubauer. A morfologia espermática foi verificada fixando-se uma alíquota de 1 µL em formol salino (0,1%) e corada com eosina-nigrosina. As laminas foram observadas em microscopia de campo claro (60 x) por um único observador, e a morfologia espermática avaliada segundo adaptação do método descrito por Miliorini et al. (2011) para espermatozoides de *Prochilodus lineatus*. Foram considerados defeitos primários aqueles derivados da espermatogênese e secundários os resultantes da fixação em formol e/ou esfregaço. Quando da presença de ambos os tipos, o espermatozoide foi considerado como portador de defeitos primários. Quando da presença de mais de um defeito na mesma categoria, o espermatozoide foi considerado portador do defeito que mais influencia a fertilização (cabeça defeituosa (HD) > cauda defeituosa (TD) > macrocefalia (MAC)/ microcefalia (MIC) ou cabeça livre (DH) > cauda com simples dobra (SBT)). Duzentos espermatozoides foram contados por laminas, e a contagem foi realizada com um contador automático que registra até sete categorias.

Depois de retiradas as alíquotas para as análises dos parâmetros espermáticos, o sêmen restante foi adicionado de inibidor de protease (Martins et al., 2013) e congelado a -20°C. As proteínas foram extraídas do sêmen (espermatozoide e plasma seminal) usando Triton X-100 e maceração com pistilo. As amostras foram sonicadas por 10 min e então centrifugadas a 8000 x g (45 min, 4°C). As proteínas foram precipitadas em acetona gelada (9:1, acetona: amostra) por 16 horas e centrifugadas (5000 x g, 15 min, 4°C) e o sobrenadante descartado. As proteínas foram ressuspendidas em tampão de amostra (0,125M Tris-HCl, 4% SDS, 20% (v/v) glicerol, 0,2 M DTT) e a concentração final de proteínas solúveis medida de acordo com Bradford (1976) (van Tilburg et al., 2013).

As proteínas (15 µg) obtidas do sêmen de ariacó foram pipetadas em gel de poliacilamida 12,5% e a eletroforese SDS-PAGE foi realizada a 500 V, 90 W, 25 mA/gel. As proteínas separadas por peso molecular no gel foram coradas com azul de Coomassie e descoradas com metanol e ácido acético. Os géis foram escaniados em 300 dpi, salvos em formato de imagem (.tiff) e estas analisadas em software Quantity One v.4.6.3 (BioRad, USA) (Martins et al., 2013; Rodriguez-Villamil et al., 2016). As bandas proteicas identificadas pelo software foram cortadas dos géis em pedaços de 1,0 mm2, submetidos à digestão tríptica (van Tilburg et al., 2013) e identificadas por espectrometria de massa ESI-Q-ToF. Os espectros obtidos foram comparados aos do servidor Mascot (Matrix Science, London, UK, v.2.6) para os bancos de dados NCBIprot e SwissProt na categoria Actinopiterygii.

Os dados foram checados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk (GraphPad Prism, 7.02). Quando necessário foram feitas transformações logarítimicas (Log(x+1)) ou angulares (Arcsine(√(x/100))). Os dados foram submetidos à análise de variância e as medias comparadas pelos testes t de Student ou Tukey usando o Statview statistics Software, version 5.0 (SAS Institute Inc. 2000).

# 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O volume de sêmen e motilidade espermática não diferiram entre o grupo controle e o tratado com hCG. Por outro lado, a concentração espermática e a porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais foram maiores nos indivíduos tratados com hCG (Tabela 1). A concentração de proteínas solúveis foi maior no sêmen dos ariacós tratados dom hCG (2, 87 ± 0,37 µg/µL) do que nos animais controle (1,61 ± 0,24 µg/µL). A eletroforese unidimensional detectou 32 tipos de banda, com um total de 71 proteínas identificadas (Fig. 1). Os géis com sêmen de peixes tratados com hCG apresentaram mais bandas que aqueles com sêmen de animais controle (p < 0.05). Além disso, cinco bandas diferentes tiveram maior intensidade no grupo tratado com hCG (p < 0.05).

Tabela 1 – Parâmetros seminais (valores médios ± S.E.M.) em ariacós adultos do grupo controle e tratado com hCG. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística por one-way ANOVA (p<0,05) e Mann Whitney (p<0,05).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Parâmetros seminais | Controle | Tratados com hCG |
| Concentração de proteína (µg/µL) | 1,61 ± 0,24 a | 2,87 ± 0,37 b |
| Volume (µL) | 232,72 ± 44,42  | 270,91 ± 59,11  |
| Motilidade (%) | 69,11 ± 9,19 | 78,19 ± 6,72  |
| Concentração espermática (x1010/ mL) | 0,52 ± 1,38 a | 2,56 ± 0,12 b |
| Morfologia normal (%) | 40,3 ± 1,65 a | 57,6 ± 3,13 b |

A abordagem proteômica adotada no presente estudo, combinando 1-D SDS-PAGE e espectrometria de massa em tandem, possibilitou a identificação das principais proteínas presentes no sêmen de *Lutjanus synagris*. Além disso, o tratamento com hCG causou diferenças significantes em alguns parâmetros seminais e no proteoma do sêmen de ariacó. Estudos prévios investigaram aspectos da qualidade do sêmen de ariacós (Gaitán-Espitia et al., 2013; Sanches et al., 2015) mas, até onde sabemos, o presente trabalho é o primeiro a reportar o proteoma do sêmen de *Lutjanus synagris*.

O tratamento com gonadotrofina coriônica humana aumentou ambas a concentração espermática e a porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais no sêmen de ariacó. O linguado do Senegal tratado com hCG apresenta gônadas com mais cistos com espermatócitos, espermátides e espermatozoides no ducto medular do que indivíduos não tratados (Guzmán et al., 2011). Estes resultados indicam que o hCG estimula certas fases da espermatogênese nesta espécie. É possível, portanto, que um mecanismo similar tenha ocorrido nos ariacós utilizados neste estudo, afetando a concentração espermática em nossas amostras.

O tambaqui, quando injetado com extrato de pituitária de carpa (CPE), apresenta espermatozoides com menos anormalidades morfológicas (15%) do que quando não tratados (25%) (Maria et al., 2011). Este efeito pode ser explicado pela hidratação causada pelo tratamento hormonal (Schulz and Miura, 2002) facilitando a extrusão do sêmen durante a coleta. Apesar dos efeitos positivos na concentração espermática e morfologia, o tratamento com hCG não aumentou nem o volume ou a motilidade nos espécimes utilizados neste estudo.

Fig. 1 – Sêmen de ariacó separado por SDS-PAGE unidimensional. Pontos pretos indicam os tipos de bandas individualmente submetidas à ESI-Q-TOF. MW- peso molecular (220-14 KDa).

Apesar de o hormônio luteinizante (LH) e o hCG serem entidades moleculares distintas, compartilham similaridades em estrutura, função e interagem com um receptor comum. Já foi reportado que o tratamento com hCG ativa as células de Leydig e de Sertoli, além de deflagrar a proliferação de espermatogônias, meiose e espermiogênese em enguias japonesas e europeias (Colombo et al., 1987; Miura et al., 1991). No presente estudo, hCG afetou a concentração espermática e a morfologia possivelmente por ter induzido a secreção de esteroides e os mecanismos moleculares pelos quais as células de Sertoli e de Leydig promovem um microambiente ótimo para a espermatogênese e espermiogênese ocorrerem.

O tratamento com hCG aumentou a expressão de proteínas específicas no sêmen de ariacó, tais como *PSPs, heat shock protein 90, ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1, transferrin*, dentre outras (Tabela 2). A *PSP* é a espermadesina encontrada em plasma seminal de porcos, cavalos e touros (Topfer-Petersen et al., 1998). As *PSP*s se ligam a carboidratos e potencialmente às glicoproteínas da zona pelúcida (Topfer-Petersen et al., 1998). Yanagimachi et al. (2013) analisaram a fertilização em sete espécies de peixes e concluíram que, quando próximo da micrópila, os espermatozoides parecem mudar de rota em direção ao poro. Além disso, os mesmos autores sugeriram que essa atração era mediada por uma glicoproteína. As interações espermatozoide-ovócito ainda não estão completamente elucidadas e as *PSP*s podem estar envolvidas no direcionamento do espermatozoide para a micrópila, mas outras investigações devem ser conduzidas com ariacós para confirmar esta hipótese.

Muitas proteínas expressas diferencialmente no sêmen de ariacós tratados com hCG contribuem para a proteção espermática, incluindo *Heat Shock Protein 90 (HSP90AA1), HSP70 kDa and HSP60 kDa, ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1* e *transferrin*. As *HSP*s ajudam no dobramento, montagem e desmontagem de outras proteínas (Sreedhar and Csermely 2004). *HSP90AA1* foi encontrada em plasma seminal de carpa (Dietrich et al., 2014 b). *Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1* também foi mais expressa em ariacós tratados com hCG do que em animais controle. Esta enzima age degradando e reciclando outras proteínas, removendo cadeias peptídicas pequenas ou flexíveis da porção carboxi-terminal da ubiquitina (Yi, et al., 2007). A *transferrin* também foi expressa diferencialmente no sêmen de ariacós tratados com hCG. Esta proteína é uma das principais no plasma seminal de carpa (Wojtczak et al., 2007) e se liga à ferro e outros metais protegendo a célula contra danos oxidativos. Estas diferenças indicam que o metabolismo celular nos ariacós tratados com hormônio estava mais eficiente do que nos não tratados.

Tabela 2 – Bandas proteicas diferencialmente expressas no sêmen de ariacós tratados com hCG com principais proteínas, seu peso molecular, número de acesso no banco de dados NCBIProt ou SwissProt e sequência coberta por ESI-Q-ToF. Tipos de banda se refere à Fig. 1.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Tipo de banda | Peso molecular (kDa) | Proteína/ Número de acesso | Escore MS/MS  | Sequência coberta(%) |
| *Major seminal plasma glycoprotein PSPI* |
| 3 | 115.47 | PSP1\_PIG | 101 | 18 |
| *Ubiquitin carboxylterminal hydrolase 5 isoform X1* |
| 5 | 106.17 | 736155207 | 54 | 2 |
| *Heat shock protein 90* |
| 8 | 96.7 | 388461388 | 438 | 13 |
| *Dynein intermediate chain 1, axonemal* |
| 9 | 95.24 | 317419097 | 75 | 2 |
| *Transferrin* |
| 10 | 87.91 | 954330816 | 54 | 2 |

**4- CONCLUSÃO**

# O tratamento com hCG aumenta a concentração espermática e a porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais, bem como causa alterações no proteoma do sêmen de ariacó. As proteínas seminais super expressas após o tratamento com hCG estão potencialmente envolvidas na proteção espermática. Estas descobertas abrem caminhos para que novas pesquisas incrementem ainda mais as tecnologias de cultivo de peixes, técnicas de reprodução assistida e preservação de gametas.

# 5- AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Pessoal (CAPES) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo financiamento do projeto e concessão de bolsa.

# 6- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Boza-Abarca, J.; Calvo-Vargas, E.; Solis-Ortiz, N.; Komen, H, 2008. Induced spawning and larval rearing of spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, at the Marine Biology Station, Puntarenas, Costa Rica. **Biol**. 34, 239–252.

Cabrera, J.R., Barrios, T.C., Quijada, J.M., 1998. Induccón al desove del pargo del mangle, *Lutjanus grieus* Linnaeus (Pisces: Lutjanidae), sexualmente maduro en cativeiro, **Arquivo de Ciências do Mar**, 31, (1-2): 57-63.

Cabrita, E., Martínez-páramo, S., Gavaia, P.J., Riesco, M.F., Valcarce, D.G., Sarasquete, C., 2014. Factors enhancing fi sh sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**.

Caltabellotta, F., Damasio, L., Vila Nova, D. Lane snapper, Mutton snapper, Yellowtail snapper. **Monterey Bay Aquarium’s Seafood Watch**, 2016. 71pp. http://www.seafoodwatch.org/-/m/sfw/pdf/reports/s/mba\_seafoodwatch\_brazil\_snapper\_report.pdf

Colombo, G., Grandi, G., Romeo, A., Giovannini, G., Pelizzola, D., Catozzi, L., Piffanelli, A., 1987. Testis cytological structure, plasma sex steroids, and gonad cytosol free steroid receptors of heterologous gonadotropin (hCG)-stimulated silver eel, *Anguilla anguilla* L. **Gen. Comp. Endocrinol**. 65, 167–178

Dietrich, M.A., Arnold, G.J., Fröhlich, T., Ciereszko, A., 2014 a. In-depth proteomic analysis of carp (*Cyprinus carpio* L) spermatozoa. **Comp. Biochem. Physiol**. - Part D Genomics Proteomics 12, 10–15.

Dietrich, M.A., Arnold, G.J., Nynca, J., Fröhlich, T., Otte, K., Ciereszko, A., 2014 b. Characterization of carp seminal plasma proteome in relation to blood plasma. J. **Proteomics** 98, 218–232.

Dumas, S., Rosales-Velázquez, M.O., Contreras-Olguín, M., Hernández-Ceballos, D., Silverberg, N, 2004. Gonadal maturation in captivity and hormone-induced spawning of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*. **Aquaculture** 234, 615–623.

Emata, A.C., 2003. Reproductive performance in induced and spontaneous spawning of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*: a potential candidate species for sustainable aquaculture, **Aquaculture Research** 849–857.

Gaitán-espitia, J.D., Martínez-silva, M.A., Borrero, C.E., Ramírez, L., Valencia, J.P., 2013. Cryogenic preservation of sperm from lane snapper (*Lutjanus synagris*): Testing the effects of extenders and freezing rates on sperm quality. **Aquaculture** 384–387, 6–12.

Guzmán, J.M., Luckenbach, A., Goetz, F. W., Fairgrieve, W. T., Middleton, M. A., Swanson, P. 2015. Reproductive dysfunction in cultured sablefish (*Anoplopoma fimbria*). **Bull. Fish. Res. Agen**. No. 40，111－119.

Guzmán, J.M., Ramos, J., Mylonas, C.C., Mañanós, E.L., 2011. Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) treatments on the stimulation of male Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reproduction. **Aquaculture** 316, 121–128.

Ibarra-Castro, L., Alvarez-Lajonchère, L., 2011. GnRHa-induced Multiple Spawns and Volition Spawning of Captive Spotted Rose Snapper, *Lutjanus guttatus*, at Mazatlan, Mexico**. J. World Aquac. Soc**. 42, 564–574.

Li, P., Hulak, Æ.M., Linhart, Æ.O., 2009. Sperm proteins in teleostean and chondrostean (sturgeon) fishes, **Fish Physiology and Biochemistry** 567–581.

Mañanós, E., Carrillo, M., Sorbera, L.S., Mylonas, C.C., Asturiano, J.F., Bayarri, M.J., Zohar, Y., Zanuy, S., 2002. Luteinizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue. **J. Fish Biol**. 60, 328–339.

Maria, A.N., Azevedo, H.C., Santos, J.P., Carneiro, P.C.F., 2012. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote** 20, 39–43.

Martins, J.A.M., Souza, C.E.A., Silva, F.D.A., Cadavid, V.G., Nogueira, F.C., Domont, G.B., de Oliveira, J.T.A., Moura, A.A., 2013. Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. **Small Rumin. Res**. 113, 115–127.

Miliorini, B., David, L., Murgas, S., Rosa, P.V., Oberlender, G., 2011. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquac. Res**. 177–187.

Minton, R.V., Hawke, J.P., Tatum, W.M., 1983. Hormone induced spawning of red snapper, *Lutjanus campechanus*. **Aquaculture** 30, 363–368.

Miura, T., Yamauchi, K., Nagahama, Y., Takahashi, H., 1991. Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. **Zool. Sci**. 8, 6373.

Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2009. General and Comparative Endocrinology Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **Gen. Comp. Endocrinol**. doi:10.1016/j.ygcen.2009.03.007

Nielsen, R., Nielsen, M., Abate, T. G., Hansen, B. W., Jepsen, P. M., Nielsen, S. L., Støttrup, J. G. and Buchmann, K. 2017.The importance of live-feed traps – farming marine fish species. **Aquac Res**. doi:10.1111/are.13281.

Nynca, J., Arnold, G.J., Fröhlich, T., Otte, K., Ciereszko, A., 2014 a. Proteomic identification of rainbow trout sperm proteins. **Proteomics** 14, 1569–1573.

Nynca, J., Arnold, G.J., Otte, K., Flenkenthaler, F., Ciereszko, A., 2014. Proteomic identification of rainbow trout seminal plasma proteins, **Proteomics** 133–140.

Phelps, R.P., Papanikos, N., Bourque, B.D., Bueno, F.T., Hastey, R.P., Maus, D.L., Ferry, A., Davis, D.A., 2009. Spawning Red Snapper (*Lutjanus campechanus*) in Response to Hormonal Induction or Environmental Control in a Hatchery Setting. **Rev. Fish. Sci.** 17, 149–155. doi:10.1080/10641260802505689

Riley, K.L., Holladay, C.G., Chesney, E.J., Tiersch, T.R., 2004. Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). **Aquac. Res**. 238, 183–194.

Rodríguez-Villamil, P., Hoyos-Marulanda, V., Martins, J.A.M., Oliveira, A.N., Aguiar, L.H., Moreno, F.B., Velho, A.L.M.C.S., Monteiro-Moreira, A.C., Moreira, R.A., Vasconcelos, I.M., Bertolini, M., Moura, A.A., 2016. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. **Theriogenology** 85, 540–554.

Sanches, E.G., Oliveira, I.R, Serralheiro, P.C.S, Cerqueira, V. R., 2015. Sperm cryopreservation of lane snapper *Lutjanus synagris* **Braz. J. Biol**., 75, 662–669. doi:10.1590/1519-6984.20613

Schulz, R.W. & Miura, T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiol. Biochem**. 26, 43–56.

Sorbera, L.A., Mylonas, C.C., Zanuy, S., Carrillo, M., Zohar, Y., 1996. Sustained administration of GnRHa increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass. **J. Exp. Zool**. 276, 361–368. doi:10.1002/(SICI)1097-010X(19961201)276:5<361::AID-JEZ6>3.0.CO;2-M

Souza, R.L.M., Vettorazzi, M.B., Kobayashi, R.K., Furtado-Neto, M.A.A., 2016. Reprodução do ariacó, *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758), Sob cultivo, em resposta a indução hormonal. **Arq. Ciências do Mar** 49, 68–76.

Souza, R.L.M., Vettorazzi, M.B., Kobayashi, R.K., Neto, M.A.A.F., 2015. Eugenol as an anaesthetic in the management of farmed lane snapper, *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758). **Rev. Cienc. Agron**. 46, p. 532-538.

Sreedhar, A.S., Csermely, P., 2004. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. **Pharmacol. Ther**. 101, 227–257. doi:10.1016/j.pharmthera.2003.11.004

Töpfer-Petersen, E., Romero, A., Varela, P.F., Ekhlasi-Hundrieser, M., Dostàlovà, Z., Sanz, L., Calvete, J.J., 1998. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia** 30, 217–224. doi:10.1111/j.1439-0272.1998.tb01163.x

van Tilburg, M.F., Rodrigues, M.A.M., Moreira, R.A., Moreno, F.B., Monteiro-Moreira, A.C.O., Cândido, M.J.D., Moura, A.A., 2013. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology** 79, 1247–1261. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.03.013

Vermeirssen, E.L.M., Mazorra De Quero, C., Shields, R.J., Norberg, B., Kime, D.E., Scott, A.P., 2004. Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotrophin-releasing hormone agonist implant. **Aquaculture** 230, 547–567. doi:10.1016/S0044-8486(03)00414-9

Vettorazzi, M.B., Teixeira, E.G., Souza, R.L.M., César, J.R.O. Furtado-Neto, M.A.A. , 2010, Motilidade espermática do sêmen do Ariacó, *Lutjanus synagris*. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 43, n. 2, p. 21-26.

Weil, C., Crim, L.W., 1983. Administration of LHRH analogues in various ways: effect on the advancement of spermiation in pre spawning landlocked salmon, *Salmo salar*. **Aquaculture** 35, 103–115.

Wojtczak, M., Dietrich, G.J., Irnazarow, I., Jurecka, P., Słowińska, M., Ciereszko, A., 2007. Polymorphism of transferrin of carp seminal plasma: Relationship to blood transferrin and sperm motility characteristics. **Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol**. 148, 426–431. doi:10.1016/j.cbpb.2007.07.011

Yanagimachi, R., Cherr, G., Matsubara, T., Andoh, T., Harumi, T., Vines, C., Pillai, M., Griffin, F., Matsubara, H., Weatherby, T., Kaneshiro, K., 2013. Sperm attractant in the micropyle region of fish and insect eggs. **Biol. Reprod**. 88, 47. doi:10.1095/biolreprod.112.105072

Yi, Y.-J., Manandhar, G., Sutovsky, M., Li, R., Jonakova, V., Oko, R., Park, C.-S., Prather, R.S., Sutovsky, P., 2007. Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-Activity Is Involved in Sperm Acrosomal Function and Anti-Polyspermy Defense During Porcine Fertilization. **Biol. Reprod**. 77, 780–793. doi:10.1095/biolreprod.107.061275

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

Zupa, R., Rodrõâguez, C., Mylonas, C.C., Rosenfeld, H., Fakriadis, I., Papadaki, M., Peârez, J.A., Pousis, C., Basilone, G., Corriero, A., 2017. Comparative study of reproductive development in wild and captive-reared greater amberjack *Seriola dumerili* (Risso, 1810). **PLoS One** 12, 1–28. doi:10.1371/journal.pone.0169645