

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AMBIENTES LITORÂNEOS E INSULARES
Mestrado em Ciências Ambientais

Yara Nantes Vasconcelos

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DA
CONDIÇÃO REPRODUTIVA DE *Holothuria (Halodeima) grisea* Selenka,
1867 NA ARMAÇÃO DO ITAPOCOROY, SANTA CATARINA, SUL DO
BRASIL.**

Programa de Pós-Graduação
em Ambientes Litorâneos
e Insulares - UNESPAR

Paranaguá

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AMBIENTES LITORÂNEOS E INSULARES
Mestrado em Ciências Ambientais

Yara Nantes Vasconcelos

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS EMPREGADOS PARA A
DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO REPRODUTIVA DE *Holothuria*
(*Halodeima*) *grisea* Selenka, 1867 NA ARMAÇÃO DO ITAPOCOROY,
SANTA CATARINA, SUL DO BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambientes Litorâneos e Insulares – PALI – da Universidade Estadual do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais. Área de concentração: Conservação da biodiversidade em ambientes litorâneos e insulares.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Damian Borges
Guilherme

Coorientadora: Profa. Dra. Yara Aparecida Garcia
Tavares

Programa de Pós-Graduação
em Ambientes Litorâneos
e Insulares - UNESPAR

Paranaguá

2025

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UNESPAR e Núcleo de Tecnologia de Informação da UNESPAR, com Créditos para o ICMC/USP e dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Nantes Vasconcelos, Yara
AVALIAÇÃO DE MÉTODOS EMPREGADOS PARA A
DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO REPRODUTIVA DE *Holothuria*
(*Halodeima*) *grisea* Selenka, 1867 NA ARMAÇÃO DO
ITAPOCOROY, SANTA CATARINA, SUL DO BRASIL. / Yara
Nantes Vasconcelos. -- Paranaguá-PR, 2025.
43 f.: il.

Orientador: Pablo Damian Borges Guilherme.
Coorientador: Yara Aparecida Garcia Tavares.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
Mestrado Acadêmico em Ambientes Litorâneos e
Insulares) -- Universidade Estadual do Paraná, 2025.

1. Análises Macro e Microscópica Biologia
Reprodutiva *Holothuria grisea*. I - Damian Borges
Guilherme, Pablo (orient). II - Aparecida Garcia
Tavares, Yara (coorient). III - Título.

Universidade Estadual do Paraná – UNESPAR
Programa de Pós-Graduação em Ambientes Litorâneos e Insulares – PALI

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO



No dia 28 de fevereiro de 2025, às 09:00h, reuniu-se a banca examinadora da dissertação de mestrado do discente Yara Nantes Vasconcelos, orientado pelo professor Dr. Pablo Damian Borges Guilherme e coorientado pela professora Dra. Yara Aparecida Garcia Tavares, com o título "**Avaliação de ferramentas empregadas para análise de estágio gametogênico para o cultivo e larvicultura de *Holothuria (Halodeima) grisea* Selenka, 1867 no Brasil.**". A apresentação e defesa pública do trabalho ocorreu de forma *online*. Após a apresentação pública e arguição pelos membros da banca a dissertação foi considerada: **Aprovada**.

Observações e sugestões da banca: Acatar impreterivelmente as sugestões e correções apresentadas pela banca examinadora, e condicionado as observações do orientador e coorientador no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, a contar da data de defesa.

A sessão foi encerrada às 11:20h.

ESTE DOCUMENTO NÃO CONFERE O TÍTULO DE MESTRE, que depende de outros requisitos, dentre os quais a entrega da dissertação definitiva.

A banca foi composta pelos professores doutores abaixo, que assinam a presente ata:

Dr. Pablo Damian Borges Guilherme (UNESPAR/Paranaguá)	Orientador e presidente da banca	Assinatura Documento assinado digitalmente  PABLO DAMIAN BORGES GUILHERME Data: 28/02/2025 11:27:23-0300 Verifique em https://validar.it.gov.br
Drª. Yara Aparecida Garcia Tavares (UNESPAR/Paranaguá)	Coorientadora	Assinatura Documento assinado digitalmente  YARA APARECIDA GARCIA TAVARES Data: 28/02/2025 11:49:42-0300 Verifique em https://validar.it.gov.br

Dr. Guilherme Rupp (EPAGRI)	Examinador	Assinatura  Documento assinado digitalmente GUILHERME SABINO RUPP Data: 28/02/2025 11:35:24-0300 Verifique em https://validar.ib.gov.br
Dr. Walter R. Pinto Cerqueira (UEFS)	Examinador	Assinatura  Documento assinado digitalmente WALTER RAMOS PINTO CERQUEIRA Data: 28/02/2025 11:41:32-0300 Verifique em https://validar.ib.gov.br
Dr ^a . Cassiana Baptista Metri (UNESPAR/Paranaguá)	Suplente	Assinatura
Dr. Rafael Metri (UNESPAR/Paranaguá)	Suplente	Assinatura

Programa de Pós-Graduação
em Ambientes Litorâneos
e Insulares - UNESPAR

Veni, vidi, vici.

“Julio Cesar”

Dedico este trabalho à minha família, alicerce de amor e força, ao meu noivo, companheiro de sonhos, a Deus, fonte de luz e esperança, aos meus amigos, que foram refúgio nas tempestades e impulso nas conquistas, e a todos os animais, que, de forma direta ou silenciosa, ofereceram suas vidas para que este estudo fosse possível.

AGRADECIMENTOS

Nas marés do tempo, seguimos entre ventos incertos e horizontes que se revelam aos poucos, guiados por luzes que habitam tanto o mundo quanto o coração. Esta dissertação não é fruto de uma travessia solitária, mas eco das vozes, gestos e presenças que me acompanharam, silenciosa ou intensamente, ao longo deste percurso.

À minha família, meu porto mais seguro, que acolheu minhas tempestades e minhas calmarias, deixo a mais terna gratidão e todo meu amor. Aos amigos que, como constelações fiéis, iluminaram as noites mais longas com palavras que aquecem e presenças que acalmam, mesmo quando apenas alcançavam pela distância. E ao meu noivo, companheiro de todas as águas — profundas, revoltas ou serenas — agradeço por ser âncora quando precisei de chão e vela quando precisei de impulso; por ser força, abrigo e horizonte.

Aos mestres e colegas que dividiram saberes e caminhos, enriquecendo cada passo com perguntas, reflexões e descobertas, ofereço meu reconhecimento sincero. À ciência, que nos ensina a ouvir o sutil chamado do oceano e a decifrar, com reverência, seus segredos milenares. E ao próprio mar, cuja imensidão me inspira, desafia e recorda que tudo vive em ciclos, entrego minha admiração eterna.

Aos que partiram durante esta jornada — meus queridos animais, cuja presença coloriu meus dias e cuja ausência agora repousa como pegadas suaves na areia — deixo um suspiro de carinho, saudade e gratidão pelo que permanece vivo na memória.

Este trabalho é, assim, um tributo àqueles que moldaram meu caminho e à natureza que, com sua paciência ancestral, nos mostra que cada fim se dobra em recomeço, e que há beleza até no silêncio entre duas ondas.

Agradeço a profa. Dra. Yara Tavares e o prof. Dr. Pablo Damian por sua orientação, acolhida e confiança, que sustentaram esta travessia acadêmica. Agradeço ao Prof. Adriano Marenzi, pela sua disposição durante as coletas, e ao Prof. Guilherme Rupp por toda parceria e material cedido para que o estudo pudesse ser realizado.

A todos que, de algum modo, tocaram esta jornada e deixaram suas marcas em mim, oferto meu mais profundo agradecimento.

RESUMO

Holoturoides como *Holothuria (Halodeima) grisea* possuem elevada importância ecológica e interesse econômico, o que torna essencial o conhecimento sobre sua biologia reprodutiva afim de subsidiar futuras propostas de manejo e conservação. O presente estudo avaliou diferentes métodos de análise da condição reprodutiva (macro e microscópicos) dessa espécie em Armação do Itapocoroy (Penha, SC) nas estações de primavera e verão. Trinta e quatro espécimes foram coletados entre novembro/2022 e fevereiro/ 2023 (Licença MMA/SISBIO 6821) e transportados até o Centro de Maricultura do CTTMAr (UNIVALI) onde foram pesados, mensurados e dissecados para extração de gônadas (análise histológica) e parede do corpo (índice gonadal). Dados sobre a coloração, dimensões dos túbulos gonadais (DTG), descrições dos estágios gametogênicos (EG) e biometria dos ovócitos (DM: diâmetro médio) foram obtidos por observações visuais, medições sob microscópio estereoscópio e de fotomicrografias dos preparados histológicos. A razão sexual (RS) foi testada (χ^2) e calculados os índices gonadal (Peso Total - IGPT e da Parede do Corpo - IGPC) e o de maturidade (IM - scores dos EG). Todos os dados quando testados estatisticamente (software R) utilizaram ANOVAs bifatoriais (sexo e estação) adotando-se 5% de significância. A RS total não diferiu de 1:1 sendo 10♂, 21♀ e 3 indeterminados (14,43 cm \pm 2,16 cm e 116,04 g \pm 24,51). As gônadas apresentaram 11 padrões de coloração com menor variabilidade cromática nos indivíduos maduros (fêmeas: tonalidades rosadas e machos: bege e creme). O IGPC foi maior que o IGPT com forte influência sazonal (valores maiores na primavera). Cinco estágios foram observados (Proliferação ou “crescendo”, Prematuro, Maduro, Emissão e Pós-desova) com predominância das fêmeas nos estágios iniciais/intermediários na primavera e os maiores valores do IM associados aos estágios de emissão (primavera) e pós-desova (verão) para ambos os sexos. Um total de 4.813 ovócitos (5,54 < DM < 105,68 μ m) foram mensurados e duas modas representativas identificadas (17 e 58 μ m) para a construção dos seguintes intervalos de tamanho: ovócitos em crescimento (DM < 17 μ m) e em vitelogênese (17 < DM < 58 μ m) e maduros (DM > 58 μ m), com os dois primeiros prevalecendo na primavera. Na população de Armação de Itapocoroy foram observadas mudanças na condição reprodutiva entre estações, com gônadas em amadurecimento e maturação na primavera, e eliminação maciça dos gametas até a exaustão no verão confirmando dados pretéritos. Pequenas variações interanuais são possivelmente moduladas por fatores ambientais, que também contribuem para distinções no fitness individual observados. Quanto aos métodos utilizados aponta-se que embora as macroscópicas sejam úteis como ferramentas preliminares, elas se apresentam limitadas na assertividade, principalmente

se utilizadas isoladamente; desta forma é essencial a combinação dessas metodologias. Indica-se a utilização do IGPC como ferramenta mais sensível à biomassa gonadal e menos influenciada por variações metabólicas e comportamentais. Salienta-se que a determinação das dimensões os túbulos gonadais (comprimento, diâmetro e espessura) devem considerar o padrão de crescimento e processos de reabsorção dos mesmos. Reafirma-se que a validação histológica dos aspectos microanatômicos do tecido gonádico e a avaliação temporal da citometria ovocitária (células a fresco) trazem maior precisão nas interpretações da condição reprodutiva (e argumentações sobre as estratégias de história de vida) nos estudos reprodutivos em holoturoides.

Palavras-chave: Análises Macro e Microscópica; Biologia Reprodutiva; Citometria; Estágios Gametogênicos; Histologia Gonadal; Índice Gonadal (Gonadosomático) e Túbulos Gonadais.

ABSTRACT

Holothuroids such as *Holothuria (Halodeima) grisea* are of high ecological importance and economic interest, which makes knowledge about their reproductive biology essential in order to support future management and conservation proposals. This study evaluated different methods of analyzing the reproductive condition (macroscopic and microscopic) of this species in Armação do Itapocoroy (Penha, SC) during the spring and summer seasons. Thirty-four specimens were collected between November 2022 and February 2023 (MMA/SISBIO License 6821) and transported to the CTTMAr Mariculture Center (UNIVALI), where they were weighed, measured, and dissected for gonad extraction (histological analysis) and body wall (gonadal index). Data on coloration, gonadal tubule dimensions (DTG), descriptions of gametogenic stages (EG), and oocyte biometry (MD: mean diameter) were obtained through visual observations, measurements under a stereoscopic microscope, and photomicrographs of histological preparations. The sex ratio (SR) was tested (χ^2) and the gonadal indices (Total Weight - IGPT and Body Wall - IGPC) and maturity indices (IM - EG scores) were calculated. All data, when tested statistically (R software), used two-factor ANOVAs (sex and season) adopting 5% significance. The total SR did not differ from 1:1, with 10♂, 21♀, and 3 indeterminate (14.43 cm \pm 2.16 cm and 116.04 g \pm 24.51). The gonads presented 11 color patterns with less chromatic variability in mature individuals (females: pink tones and males: beige and cream). The IGPC was higher than the IGPT with a strong seasonal influence (higher values in spring). Five stages were observed (Proliferation or “growing,” Premature, Mature, Emission, and Post-spawning) with a predominance of females in the early/intermediate stages in spring and the highest IM values associated with the emission (spring) and post-spawning (summer) stages for both sexes. A total of 4,813 oocytes (5.54 <DM> 105.68 μ m) were measured and two representative modes identified (17 and 58 μ m) for the construction of the following size ranges: growing oocytes (DM < 17 μ m) and in vitellogenesis (17 < DM < 58 μ m) and mature (DM > 58 μ m), with the first two prevailing in spring. In the Armação de Itapocoroy population, changes in reproductive condition were observed between seasons, with gonads maturing in spring and massive elimination of gametes until exhaustion in summer, confirming previous data. Small interannual variations are possibly modulated by environmental factors, which also contribute to the observed distinctions in individual fitness. Regarding the methods used, it should be noted that although macroscopic methods are useful as preliminary tools, they are limited in their accuracy, especially when used in isolation; thus, it is essential to combine these methodologies. The use of IGPC is recommended as the most sensitive tool for gonadal biomass

and the least influenced by metabolic and behavioral variations. It should be noted that the determination of the dimensions of the gonadal tubules (length, diameter, and thickness) must consider their growth pattern and reabsorption processes. It is reaffirmed that histological validation of the microanatomical aspects of gonadal tissue and temporal evaluation of oocyte cytometry (fresh cells) provide greater accuracy in the interpretation of reproductive status (and arguments about life history strategies) in reproductive studies in holothurians.

Keywords: Macroscopic and Microscopic Analysis; Reproductive Biology; Cytometry; Gametogenic Stages; Gonadal Histology; Gonadal (Gonadosomatic) Index and Gonadal Tubules.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Localização da área de coleta na Armação do Itapocoroy, Penha, SC.....	18
Figura 2 – Procedimento de mensuração do diâmetro dos túbulos gonadais	20
Quadro 1 – Parâmetros biométricos por estação do ano e sexo de <i>Holothuria (Halodeima) grisea</i>	22
Figura 3 – Frequência relativa dos padrões de coloração gonadal por sexo e estação do ano em <i>H. (H.) grisea</i>	23
Figura 4 – Registros macroscópicos das gônadas evidenciando categorias de coloração em <i>H. (H.) grisea</i>	24
Figura 5 – Distribuição do diâmetro dos túbulos gonadais por sexo em <i>H. (H.) grisea</i>	25
Figura 6 – Variação do índice gonadosomático baseado no peso total (IGPT) entre estações em <i>H. (H.) grisea</i>	26
Figura 7 – Comparação dos índices gonadais IGPT e IGPC entre os sexos em <i>H. (H.) grisea</i>	27
Figura 8 – Índice de maturidade e frequência dos estágios de desenvolvimento gonadal (GDS) por sexo em <i>H. (H.) grisea</i>	28
Figura 9 – Distribuição do diâmetro médio dos ovócitos na primavera de 2022 em <i>H. (H.) grisea</i>	29
Figura 10 – Distribuição do diâmetro médio dos ovócitos no verão de 2023 em <i>H. (H.) grisea</i>	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1 Área de estudo	17
2.2 Procedimentos de Campo	18
2.3 Procedimentos laboratoriais	19
2.4 Procedimentos histológicos	20
2.5 Sexagem microscópica e citometria	21
2.6 Análises Estatísticas	21
3. RESULTADOS	22
4. DISCUSSÃO	30
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
6. REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

Os equinodermos destacam-se entre os invertebrados marinhos pela diversidade morfológica, ampla distribuição geográfica e relevante papel ecológico, englobando classes como Asteroidea (estrelas-do-mar), Ophiuroidea (ofiuróides), Crinoidea (crinóides), Echinoidea (equinóides) e Holothuroidea (holoturóides). Esses organismos ocorrem desde ambientes costeiros rasos até grandes profundidades oceânicas. A maioria das espécies apresenta sexos separados (dióicos) e ausência de dimorfismo sexual. (ABDEL-RAZEK *et al.*, 2005; XAVIER, L. A. R., 2010; BUENO *et al.*, 2018).

A classe Holothuroidea, que compreende os pepinos-do-mar, reúne mais de 1.600 espécies distribuídas em 25 famílias e sete ordens, das quais aproximadamente 50 ocorrem no Brasil (OLIVEIRA, 2005; BUENO *et al.*, 2018; PRATA *et al.*, 2024). Esses organismos apresentam, como característica distintiva, simetria bilateral na fase adulta e endoesqueleto reduzido, modificado em um anel calcário constituído por placas e ossículos, conferindo ao corpo textura mole e flexível (NAVARRO, 2012; MARTINS, 2012) Apresentam hábito predominantemente bentônico, com baixa mobilidade, e capacidade de reprodução tanto sexuada quanto assexuada; em muitas espécies, a liberação de gametas diretamente na coluna d'água constitui o principal modo reprodutivo (ARSAD *et al.*, 2017).

Do ponto de vista ecológico, os holoturoides desempenham papel fundamental na fauna bentônica, atuando como importantes bioturbadores em habitats de fundo inconsolidado, onde contribuem para a ciclagem de nutrientes e a estruturação do sedimento (VERGARA-CHEN *et al.*, 2015; PRATA *et al.*, 2024). São reconhecidamente sensíveis tanto a estressores naturais quanto às pressões antrópicas (ABDEL-RAZEK *et al.*, 2005). Além de sua importância alimentar e ecológica, esses organismos são utilizados na medicina tradicional oriental e na atualidade vem despertando crescente interesse científico no que tange as propriedades farmacológicas associadas a moléculas bioativas com atividades antibacterianas, antifúngicas e antitumorais (PASQUINI *et al.* 2022; BAHIDA *et al.*, 2022; MIRANDA e TAVARES, 2024; MIRANDA *et al.*, 2025; TAVARES *et al.*, 2025).

A classe reúne ainda dezenas de espécies exploradas comercialmente em todo o mundo e o maior volume das pescarias concentram-se em espécies tropicais dos gêneros *Parastichopus*, *Stichopus*, *Isostichopus*, *Holothuria*, *Actinopyga*, *Bohadschia* e *Thelenota* (TORAL-GRANDA *et al.*, 2008; PEREIRA, 2017; PONTE e FEITOSA *et al.*, 2019; PRATA *et al.*, 2024). Os

principais produtos são parede do corpo cozida e/ou desidratada (conhecidas como “bêche-de-mer”, “tre pang”, ou “hai-some”) e as gônadas e/ou musculatura processadas (“konowata”, “iriko” e “kuchiko”) (MIRANDA e TAVARES, 2024; MARTINS *et al.*, 2025). Devido a suas dimensões, a parede do corpo apresenta a maior disponibilidade de biomoléculas e o elevado teor proteico deste compartimento gera uma demanda exorbitante nos mercados asiáticos que sustenta redes comerciais internacionais de cerca de uma centena de países (VERGARA-CHEN *et al.*, 2015; BAHIDA *et al.*, 2022; MARTINS *et al.*; 2025). Esse cenário elevou a demanda global e, conseqüentemente, a exploração da atividade pesqueira desses organismos cuja sobrepesca vem sendo relatada desde o final do século XX (CONAND e BYRNE, 1993; GUI SADO *et al.*, 2012; ROBINSON e LOVATELLI, 2015; PONTE e FEITOSA *et al.*, 2019; RUPP *et al.*, 2021).

A vulnerabilidade das populações de pepinos-do-mar em todo mundo é representada principalmente pelo baixo recrutamento e reprodução dependente da densidade e que tem colapsado diversos estoques naturais (RAMÍREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2020; VENANCIO *et al.*, 2022; PURCELL *et al.*, 2023; MARTINS *et al.*, 2025). Estudos sobre a reprodução de invertebrados marinhos, como os holoturoides são uma importante fonte de informação para a potencial exploração sustentável desses recursos, proposição de planos de manejo, épocas de defeso e mesmo para analisar o potencial uso de novas espécies tanto nas pescarias quanto produção aquícola (MUTHIGA *et al.*, 2008; BUENO *et al.*, 2015; RUPP *et al.*, 2021).

No Brasil a espécie *Holothuria (Halodeima) grisea* Selenka, 1867 distribui-se sob um extenso gradiente latitudinal e suas densidades populacionais são altamente variáveis em substratos rochosos e areno-rochosos de áreas rasas (MENDES *et al.*, 2006; BUENO *et al.*, 2015; LEITE-CASTRO *et al.*, 2016; RUPP *et al.*, 2021; RUPP *et al.*, 2024). O conhecimento sobre a reprodução de *H. (H.) grisea* no país data de menos de uma década e está concentrado em apenas duas populações na região sul (Paraná e Santa Catarina) (BUENO *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2025; MIRANDA *et al.*, 2025.) e uma no Nordeste (Ceará) (LEITE-CASTRO *et al.*, 2016). De modo geral os indivíduos dessas populações exibem picos de liberação de gametas nos meses mais quentes do ano e uma redução da atividade do inverno até o início da primavera. O desenvolvimento larval é planctônico (inferior a 20 dias) e bifásico, em condições de laboratório o recrutamento e a fase jovem (comprimento < 8 cm) são atingidos em cinco meses (MARQUES, 2016; RUPP *et al.*, 2021). A maturidade sexual pode ocorrer acima dos 13 cm de comprimento total (MARTINS *et al.*, 2025).

Embora *H. (H.) grisea* ainda não integre formalmente o mercado pesqueiro no Brasil, o comércio de centenas a toneladas de indivíduos é generalizado ao longo da costa, de modo predominantemente ilegal e com inúmeras lacunas regulatórias (SOUZA JR *et al.*, 2017; PONTE e FEITOSA *et al.*, 2019; RUPP e MARENZI, 2021; AQUINO-SOUZA, 2023 MARTINS *et al.*, 2025). Iniciativas em cultivos experimentais, visando uma futura produção sustentável e principalmente a conservação dos estoques naturais ainda é incipiente no país (RUPP *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a transição de um recurso potencial para uma exploração manejada de forma sustentável exige, obrigatoriamente, o domínio de sua biologia reprodutiva. Diversos métodos são utilizados na avaliação da reprodução dos holoturoides sendo ampla também a discussão sobre a assertividade das ferramentas na determinação das condições *in situ* e entre localidades (RUPP *et al.*, 2024; RUPP *et al.*, 2025; TAVARES *et al.*, 2025). A combinação de técnicas como a avaliação da participação das gônadas sobre o peso animal (Índice gonadossomático ou Gonadossomático), a caracterização de aspectos relacionados a cor, diâmetro ou espessura e comprimento dos túbulos gonadais, as análises histológicas para a descrição dos eventos gametogênicos e determinação do *status* de maturidade (Índice de Maturidade), além da avaliação citométrica da população ovocitária integram um conjunto robusto se utilizados de modo combinado em prol da temática apresentada.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes métodos macro e microscópicos nos meses de maior condição reprodutiva (primavera e verão) da população de *H. (H.) grisea* na Armação do Itapocoroy (município de Penha, SC) trazendo ainda um panorama argumentativo sobre as ferramentas utilizadas nos estudos sobre reprodução no gênero *Holothuria*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

Armação do Itapocoroy está localizada no município de Penha (Fig. 1), no setor costeiro centro-norte do estado de Santa Catarina, sul do Brasil (26°46'10'' S e 48°49'10'' W). É uma baía protegida com 6,7 km² de extensão, profundidade máxima de 15m, e um tempo de descarga de maré de 3,6 dias. Apresenta baixo hidrodinamismo composta por leito rochoso suavemente

inclinado e um fundo arenoso composto por sedimentos grosseiros (BAIXO, 2015; VANZ *et al.*, 2018; RUPP *et al.*, 2021). O clima regional é classificado como Cfa, de acordo com Köppen-Geiger (clima subtropical úmido ou clima temperado [C], chuvoso durante todo o ano [f] com verão quente [a]) (ALVARES *et al.*, 2013).

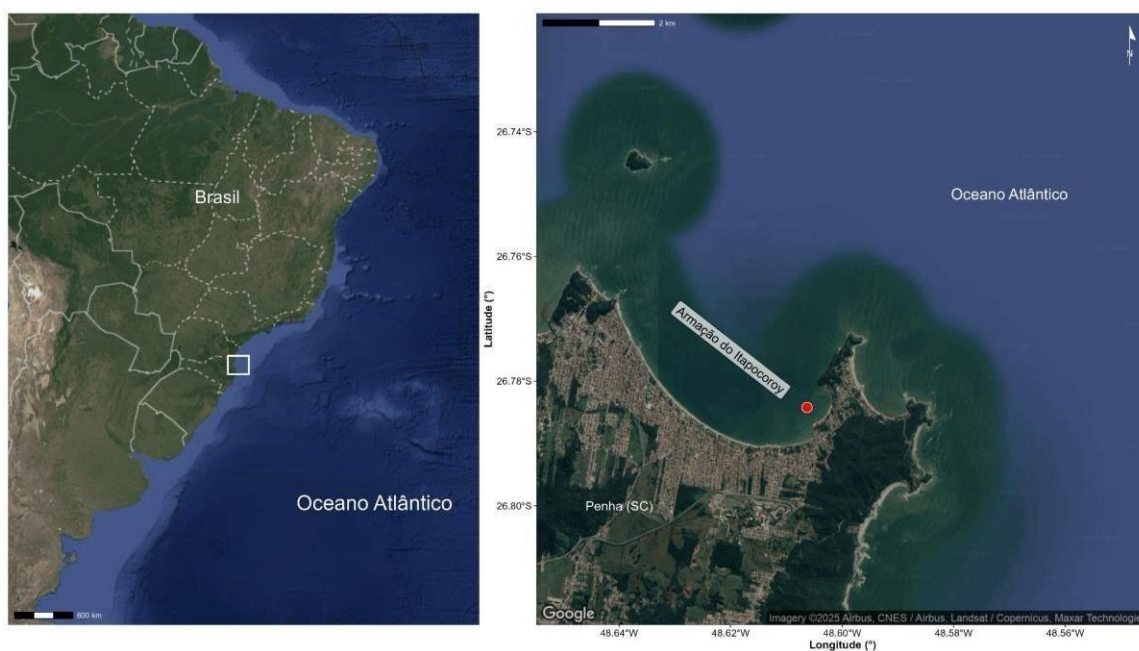


Figura 1 – Mapa de localização da área de coleta dos espécimes na Armação do Itapocoroy, município de Penha, Santa Catarina, Brasil **Fonte:** autores (2024).

2.2 Procedimentos de Campo

As coletas dos espécimens *de H. H. grisea* foram realizadas por meio da Licença MMA/SISBIO n° 6821, emitida em nome de Guilherme Sabino Rupp, pesquisador da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) referente a projeto de pesquisa em parceria com a Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) - Chamada Universal n° 12/2020.

Um total de 34 exemplares foram cedidos para a execução do presente estudo em campanhas de amostragem nos meses de novembro de 2022 (n=14; coleta de primavera) e fevereiro de 2023 (n=20; coleta de verão). Os organismos foram coletados manualmente por busca ativa na região do entremarés, em áreas de substrato rochoso-arenoso, selecionando-se aqueles que apresentavam maior tamanho em estado de relaxamento. A seguir, os espécimes foram

transportados para o Centro de Maricultura do CTTMar (UNIVALI/SC), e então anestesiados em solução de cloreto de magnésio a 7% diluído em água do mar por algumas horas antes do processamento.

2.3 Procedimentos laboratoriais

No CTTMar cada exemplar foi submetido aos procedimentos propostos por Rupp *et al.* (2021). Após a identificação individual, os organismos foram anestesiados em solução de cloreto de magnésio diluída em água marinha (7 mg/L). A seguir foi mensurado o comprimento total utilizando uma régua graduada (mm) e o peso úmido foi determinado em balança digital Quimis BG 400 (0,001 g).

Com a confirmação da perda do tônus muscular e da ausência de resposta a estímulos táteis foi realizada a dissecação para remoção dos órgãos. Durante essa etapa foram obtidos o peso da parede do corpo (g) e peso úmido das gônadas (g), com o registro do(s) padrão(ões) da coloração das gônadas *in natura*.

Os tufo de túbulos gonadais foram dispostos em uma placa de Petri, com escala graduada (mm), organizados de forma alinhada para melhor visualização. Sob iluminação de LED branca e com o auxílio de um microscópio estereoscópico, foram registrados em média três campos por exemplar.

Para a obtenção do diâmetro (mm) dos túbulos gonadais, uma linha horizontal foi traçada para orientar a sequência de mensuração (Figura 2), visando registrar as medidas próximas à primeira bifurcação dos túbulos individuais, a fim evitar medições repetidas. Em média foram mensurados 12 túbulos por tufo gonadal. O diâmetro de cada túbulo foi obtido através da medida do eixo perpendicular com o auxílio do programa ImageJ (Fiji), e, posteriormente calculada a média dos diâmetros para cada indivíduo.

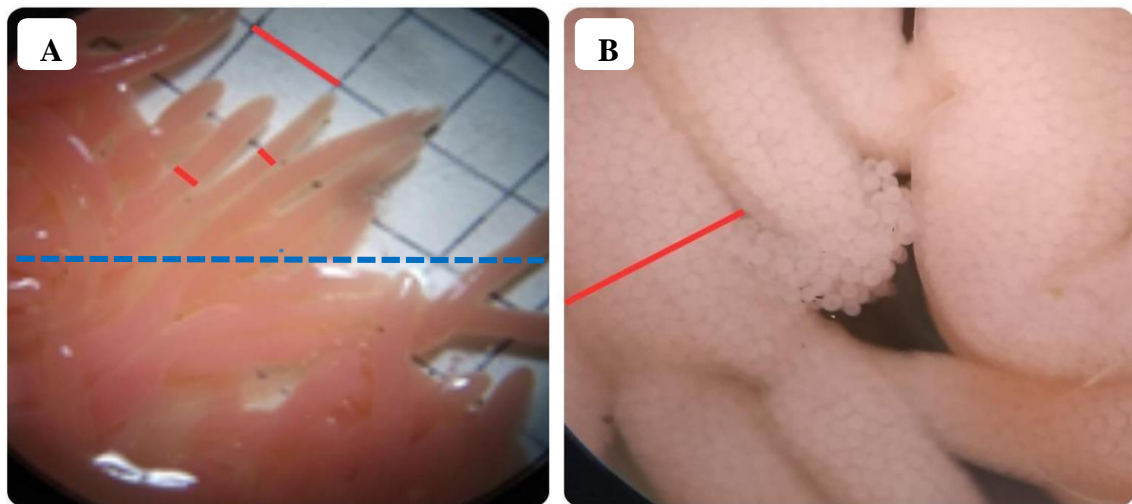


Figura 2 – Procedimento de mensuração do diâmetro dos túbulos gonadais. (A) Registro da mensuração dos túbulos sob estereomicroscópio, utilizando papel milimetrado como referência de escala; (B) Ampliação de um túbulo gonadal maduro para mensuração do diâmetro (mm). A linha azul tracejada indica a orientação da sequência de mensuração, enquanto as linhas vermelhas representam as medidas realizadas. Escala: 0,5 cm **Fonte:** autores (2024).

Após o processamento inicial e os registros fotográficos, as gônadas foram devidamente acondicionadas em frascos plásticos com solução fixadora de formalina 10% para posterior processamento no Laboratório de Biologia Marinha (LABMAR) na Universidade Estadual do Paraná - *campus* de Paranaguá (PR).

2.4 Procedimentos histológicos

Após a fixação do órgão (cerca de 48 horas) os túbulos gonadais foram conservados em solução de álcool 70%. Porções do tecido foram retiradas e submetidas a uma sequência crescente de imersões em etanol para desidratação, seguida de xileno para diafanização e posterior impregnação com parafina a 65⁰ C por 12 horas. Os cortes histológicos (5 µm) foram realizados em micrótomo rotativo manual (tipo Minot), e posteriormente corados com solução de Hematoxilina e Eosina (HE) (TAVARES *et al.*, 2025).

2.5 Sexagem microscópica e citometria

Os preparados histológicos foram observados e fotografados com o auxílio de um microscópio óptico de luz (Olympus® CX43) equipado com sistema de captura de imagem (software EP50v). Em média foram registrados seis campos visuais de cada lâmina/animal. A sexagem dos indivíduos e a identificação estágios gametogênicos seguiu os critérios estabelecidos para a mesma população em Tavares *et al*, 2025. O diâmetro dos gametas femininos (oócitos íntegros) foi obtido através da medida dos eixos perpendiculares utilizando programa de processamento de imagem ImageJ-Fiji (detalhes em TAVARES *et al*, 2025).

2.6 Análises Estatísticas

A proporção teórica de sexo 1:1 foi testada (fêmea: macho) por meio do teste Qui- quadrado (χ^2) considerando a amostra total no período do estudo. Os padrões de coloração (por sexo e estação) foram tabulados e transformados em frequência relativa (%) para a construção dos gráficos comparativos.

As análises relativas índice gonadossomático e o diâmetro dos túbulos foram avaliadas utilizando Anova bifatorial (fatores sexo e estação). O índice gonadossomático (IG) foi calculado a partir das seguintes equações: $IGPT = (\text{peso úmido das gônadas} \times \text{peso úmido total})/100$ e $IGPC = (\text{peso úmido das gônadas} \times \text{peso úmido da parede do corpo})/100$ (TAVARES *et al*, 2025). Os dados do IGPT e IGPC foram analisados por meio de uma ANOVA.

A frequência de estágio foi determinada com base na proporção de gônadas em cada fase do desenvolvimento gametogênico, conforme a classificação proposta por Tavares *et al* (2025). Cada estágio foi expresso em porcentagem e apresentado por sexo e estação. O Índice de Maturidade (IM) foi calculado pela fórmula $MI = \sum (n_i \times s_i)/N$ para a determinação de um score reprodutivo (por sexo e estação) de acordo com Navarro *et al* (2012), Benítez-Villalobos *et al*, (2013). Onde: n_i = número de indivíduos em cada estágio, s_i = pontuação atribuída a esse estágio, N = número total de espécime coletados por mês.

Os intervalos das classes do diâmetro médio (DM) foram calculados pela regra de Sturges (Sturges, 1926) e as frequências relativas das classes de tamanho foram plotadas em um gráfico de distribuição por estação. As principais coortes foram identificadas usando o método Bhattacharya (software FISAT II - Ferramentas de Avaliação de Estoques Pesqueiros da FAO-

ICLARM, 1.2.2) (Sparre e Venema, 1997). O método foi utilizado para analisar a progressão modal e determinar as coortes representativas de DM ao longo do tempo e, subsequentemente, delimitar os intervalos característicos dos estágios de oogênese (BENÍTEZ-VILLALOBOS *et al.*, 2013; TAVARES *et al.*, 2025; MIRANDA *et al.*, 2025).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R versão 4.4.2 (2024-10- 31) (R. CORE TEAM, 2024), e as diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% (p-valor < 0,05).

3. RESULTADOS

A sexagem (identificação por meio das observações microscópicas dos preparados histológicos) dos 34 exemplares de *H. (H.) grisea* coletados, distinguiu 10 machos (38,2%), 21 fêmeas e 3 indeterminados (3,0%). A análise da proporção sexual não diferiu de 1:1 ($X(1,34)=1,48;p=0,2$).

O comprimento total dos indivíduos analisados (quadro 1) apresentou média de $14,43\pm 2,16$ cm, (10 a 19,4 cm). O peso médio total registrado para os exemplares foi de $116,04\pm 24,51$ (189,62 a 81,7g).

Quadro 1 – Média dos parâmetros biométricos por estação do ano e sexo de *Holothuria (Halodeima) grisea* coletados na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil.

Média do peso	Média do comprimento	sexo	Estação
108,54 ± 24,68	14,00 ± 1,84	F	Primavera
112,69 ± 31,45	13,50 ± 2,02	M	
102,57 ± 32,80	15,80 ± 2,29	F	Verão
112,16 ± 14,46	14,00 ± 2,84	M	
116,55 ± 18,09	14,50 ± 0,71	I	

Foram registrados um total de 11 padrões de coloração com fêmeas apresentando maior frequência de tonalidades rosadas, e machos com maior associação a colorações bege e creme (Figuras 3 e 4). Na primavera, observou-se um padrão mais homogêneo de coloração. Todas as

fêmeas apresentaram coloração rosa salmão (100%), enquanto todos os machos foram classificados como creme (100%), não havendo registro de outras categorias cromáticas.

No verão, os padrões de coloração apresentaram distinções entre sexos; as fêmeas exibiram maior diversidade cromática, com predominância da coloração rosa (41,7%), seguida por bege e rosa/translúcido (ambas com 16,7%). Nos machos, a coloração bege foi mais frequente (40%), enquanto ciano/creme, creme e translúcido apresentaram frequências semelhantes (20% cada). Os indivíduos indiferenciados concentraram-se principalmente nas categorias ciano/creme (66,7%) e creme (33,3%).

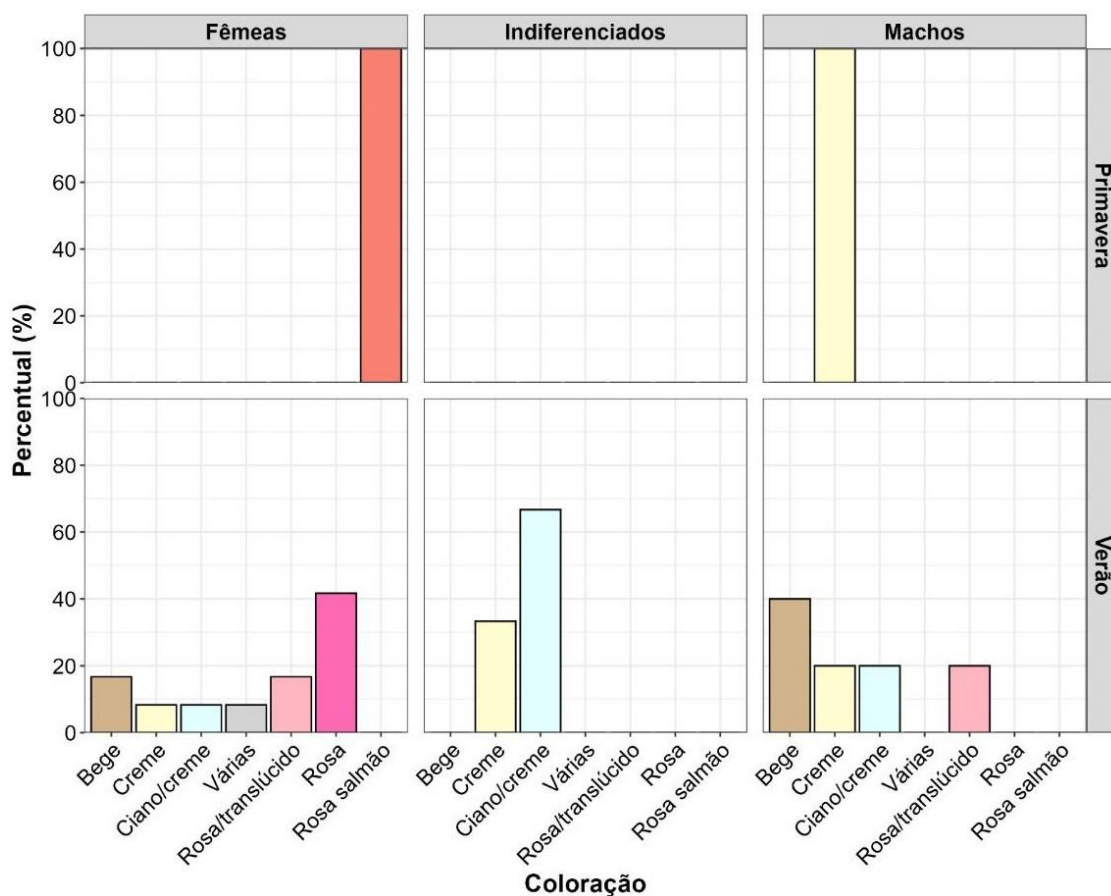


Figura 3 – Frequência relativa dos padrões de coloração da gônada por sexo (fêmeas, machos e indeterminados) e estação do ano em *Holothuria (Halodeima) grisea* coletados na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil.

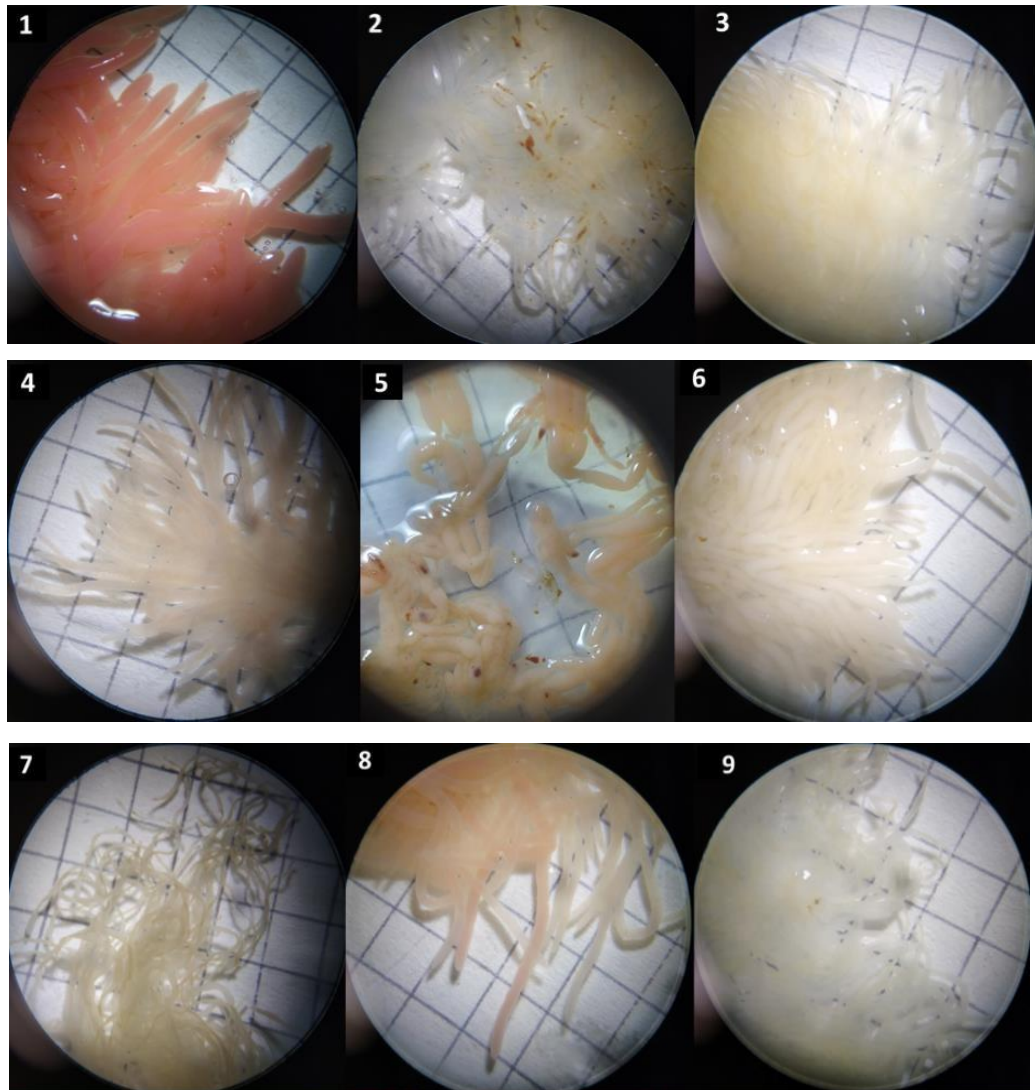


Figura 4 – Registros macroscópicos das gônadas de *Holothuria (Halodeima) grisea* obtidos sob estereomicroscópio, evidenciando diferentes categorias de coloração de espécimes coletados na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. (1) Rosa salmão; (2) Ciano/creme; (3) Ciano/rosa; (4) Rosa translúcido; (5) Rosa; (6) Creme; (7) Várias; (8) Rosa translúcido; (9) Ciano. As imagens apresentadas representam 8 das 11 categorias de coloração identificadas no estudo.

O diâmetro médio dos túbulos (figura 5) oscilou entre 0,019 mm a 0,238 mm ($0,076 \pm 0,033$ mm). As diferenças entre os sexos foram significativas ($F(2,978)=19,47; p < 0,0001$), com as fêmeas apresentando as maiores dimensões ($0,084 \pm 0,037$ mm) em comparação aos machos ($0,067 \pm 0,024$ mm). Não foram detectadas diferenças na interação entre sexos e estações. ($F(1,935)=0,002; p=0,88$).

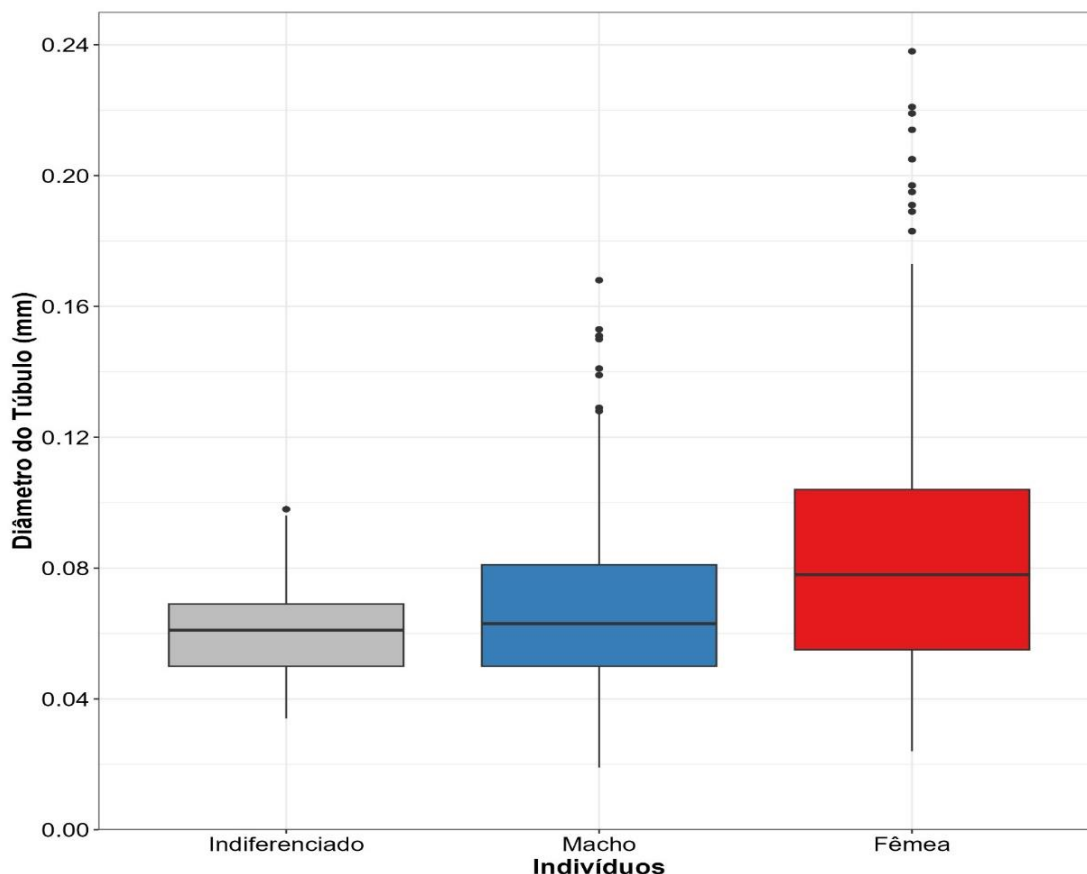


Figura 5 – Distribuição do diâmetro dos túbulos gonadais (mm) por sexo (indiferenciado, macho e fêmea) em *Holothuria (Halodeima) grisea* coletados na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil

As variações do Índice Gonadossomático (IG) foram analisadas sob duas perspectivas: a influência sazonal (considerando o Peso Total – IGPT e o Peso da Parede do Corpo – IGPC, este último apenas para os dados de verão de 2023), e entre denominadores (Peso Total vs. Parede do Corpo - IGPC).

A análise do investimento reprodutivo revelou uma forte influência sazonal sobre o IGPT (Figura 6). A ANOVA bifatorial (estação e sexo) demonstrou que apenas a estação do ano é o fator preponderante no desenvolvimento das gônadas ($F_{1,29}=22,66;p<0,001$), com os maiores valores registrados na primavera (média de $4,00\% \pm 1,79$ $n=14$) em relação ao verão (média de $1,54\% \pm 1,06$). Não foi observada interação significativa entre sexo e estação ($F_{1,29}=0,44;p=0,05$; $n=20$), indicando um padrão de maturação sincronizado. O fator sexo também não apresentou interação significativa ($F_{2,29}=2,90;p=0,07$).

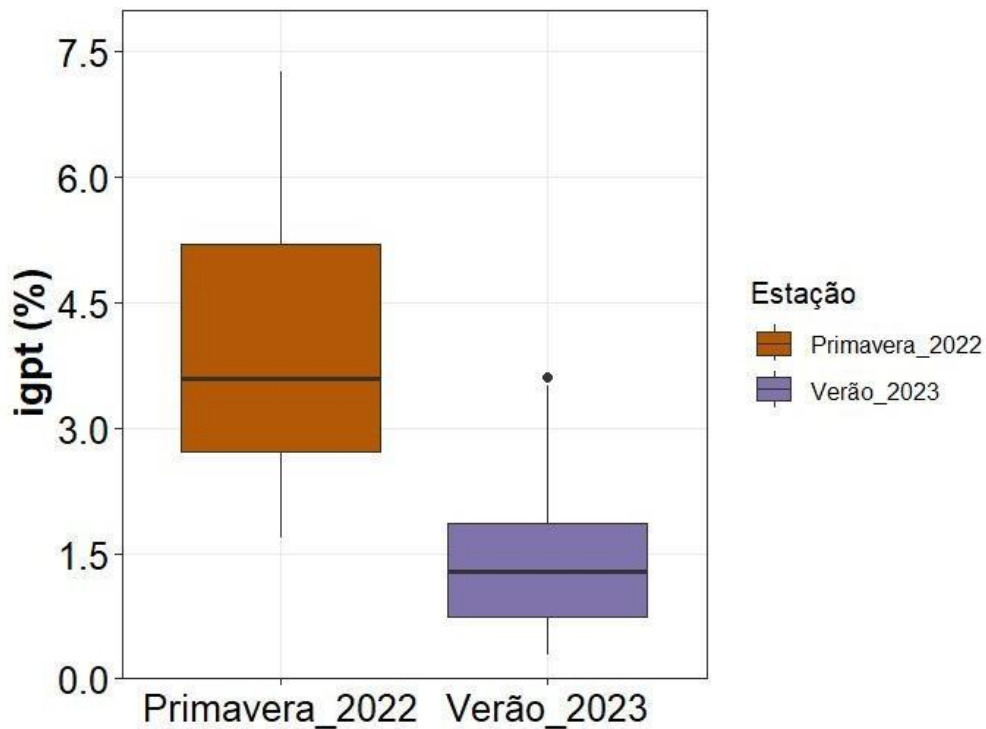


Figura 6 – Variação do índice gonadosomático baseado no peso total (IGPT) entre as estações do ano em *Holothuria (Halodeima) grisea* coletados na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil

Adicionalmente, apenas para os espécimes coletados em fevereiro de 2023, comparou-se a sensibilidade do uso de diferentes denominadores no cálculo do índice (IGPT vs. IGPC) (figura 7). O IG calculado com base na parede do corpo (IGPC) foi superior ao calculado pelo peso total (IGPT) ($F_{1,34}=9,23; p=0,004$), apresentando médias de $3,5 \pm 2,46$ e $1,6 \pm 1,04$, respectivamente. É importante ressaltar que, independentemente da métrica utilizada, não foram observadas diferenças entre os sexos para o período amostrado ($p > 0,05$).

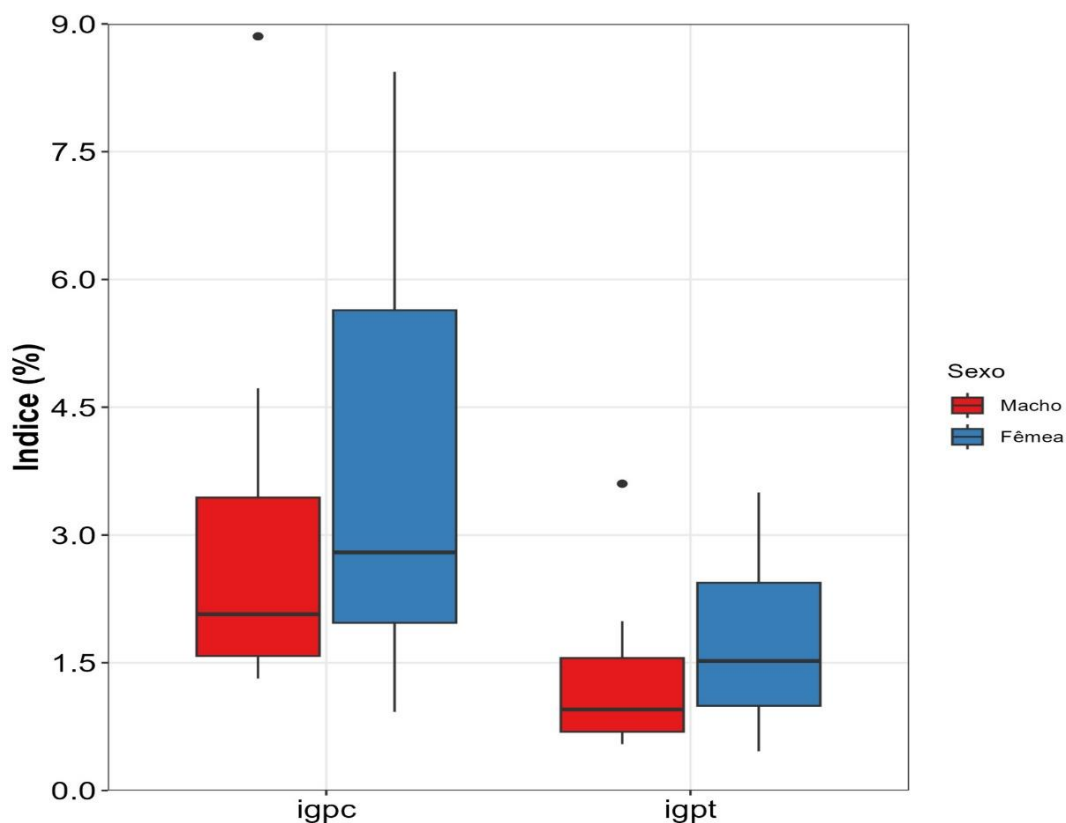


Figura 7 – Comparação entre o índice gonadosomático baseado no peso total (IGPT) e o índice gonadosomático baseado no peso da parede corporal (IGPC) por sexo (machos e fêmeas) em *Holothuria (Halodeima) grisea* coletados na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil.

Na diagnose dos eventos gametogênicos foram observados cinco estágios para fêmeas e machos (Proliferação, Prematuro, Maduro, Emissão e Pós-desova) com base na arquitetura dos túbulos, o grau de ocupação de gametas no lúmen, a presença de células fagocitárias, a quantidade e o crescimento/amadurecimento dos gametas.

A distribuição percentual dos estágios de desenvolvimento gonadal variou entre as estações analisadas (Figura 8). Na primavera de 2022, observou-se predominância de indivíduos em estágios iniciais e intermediários do ciclo reprodutivo. As fêmeas apresentaram maior frequência no estágio prematuro (55,6%), seguido por emissão (33,3%) e proliferação (11,1%). Entre os machos, o estágio maduro foi predominante (60%), seguido pelos estágios prematuro e emissão, ambos com aproximadamente 20%. Não foram registrados indivíduos nos estágios pós-desova e esgotado para nenhum dos sexos durante esse período.

No verão de 2023, houve um deslocamento do padrão para estágios mais avançados do desenvolvimento gonadal. As fêmeas concentraram-se nos estágios emissão (41,7%) e pós-desova (41,7%), enquanto o estágio crescendo representou cerca de 16,7%. Os machos apresentaram distribuição mais homogênea, com registros nos estágios proliferação (20%), prematuro (20%), emissão (40%) e pós-desova (20%). Houve a ocorrência de indivíduos classificados como esgotados, representados exclusivamente por indivíduos de sexo indeterminado (100%). O estágio maduro não foi observado nesse período. Os maiores valores do Índice de Maturidade (IM) para as fêmeas ocorreu no verão, e para os machos na primavera.

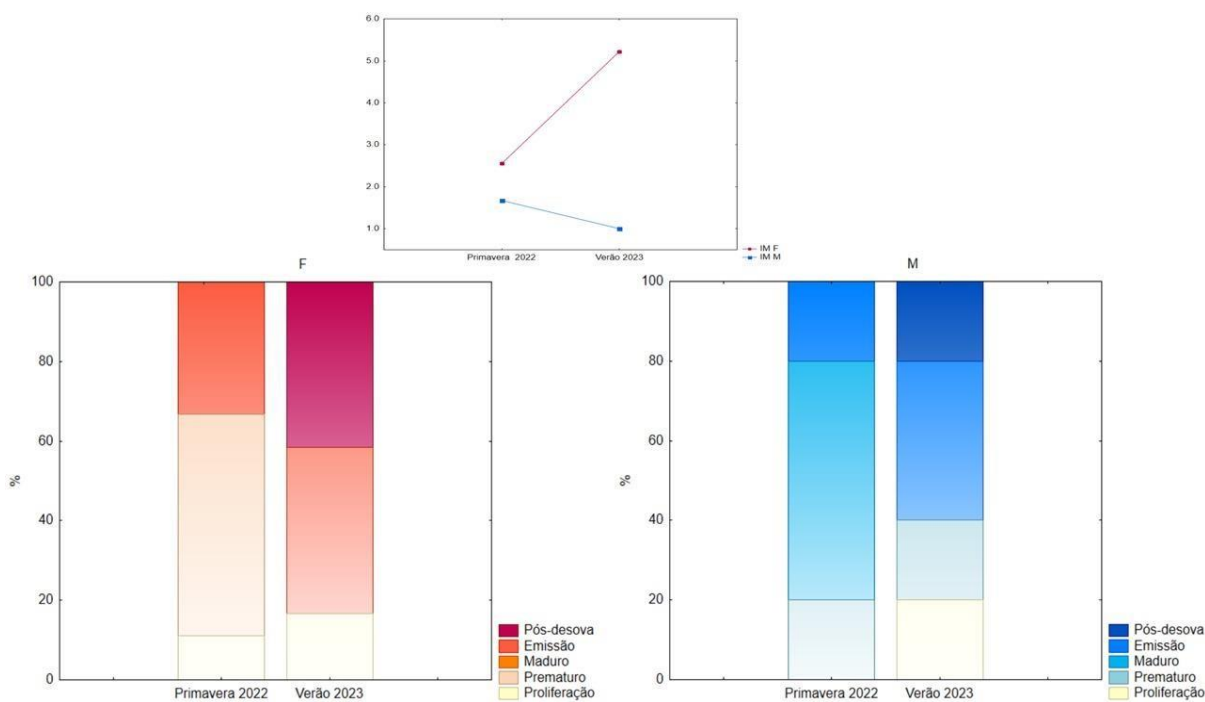


Figura 8 – Índice de maturidade e frequência relativa dos estágios de desenvolvimento gonadal (GDS) por sexo, registrados na primavera de 2022 e no verão de 2023, em *Holothuria (Halodeima) grisea* coletados na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil.

Foram mensurados 4.813 ovócitos, com diâmetros variando de 5,54 a 105,68 μm com duas modas representativas: 17 e 58 μm . A evolução do gameta feminino desse modo pode ser categorizada nos intervalos crescimento ($DM < 17 \mu\text{m}$), em vitelogênese ($17 < DM < 8 \mu\text{m}$) e maduro ($DM > 58 \mu\text{m}$).

Na primavera a maioria dos ovócitos estão em amadurecimento (65%), com poucos elementos maduros (19%) ou em crescimento (13,5%) com elevado número de gametas (n=4047 células) intensa produção. No verão há uma acentuada queda no número de gametas (n=766) onde cerca de metade dos ovócitos ainda se encontram em vitelogênese (47,5%); as proporções de gametas maduros (28,2%) e em crescimento (24,2%) aumentam consideravelmente em relação a estação anterior (figuras 9 e 10).

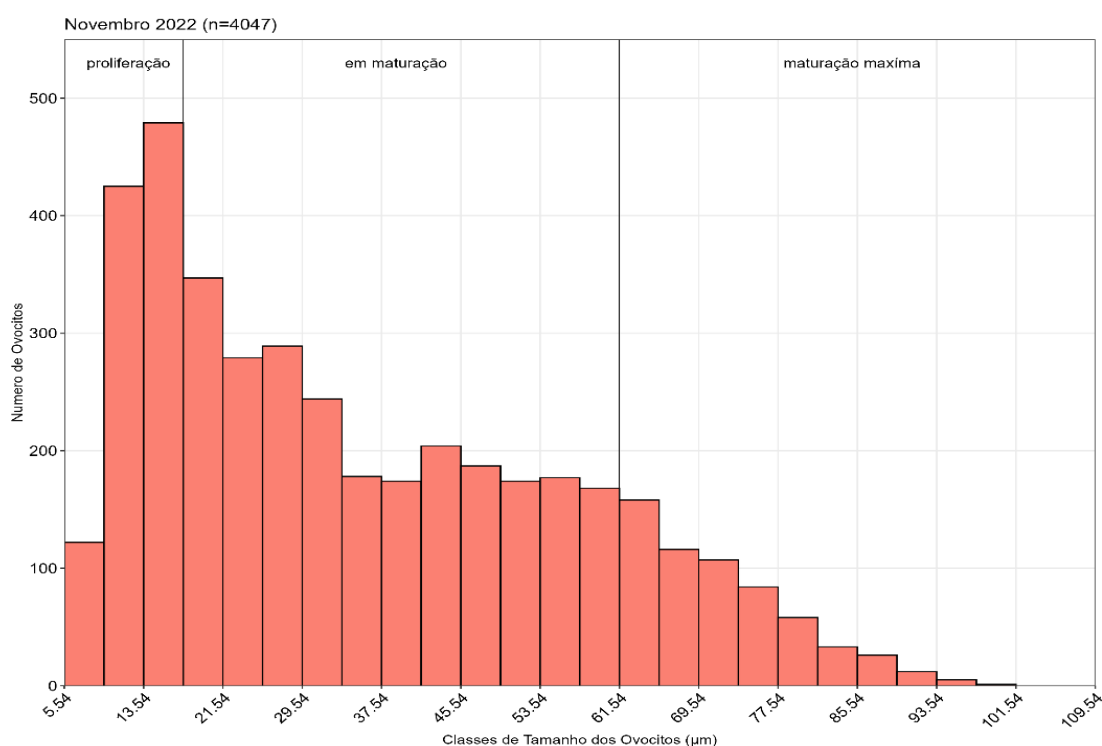


Figura 9 – Distribuição da frequência do diâmetro médio dos ovócitos de *Holothuria (Halodeima) grisea* durante a primavera de 2022, na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. As linhas verticais indicam os limites entre as classes associadas aos diferentes estágios de desenvolvimento ovocitário.

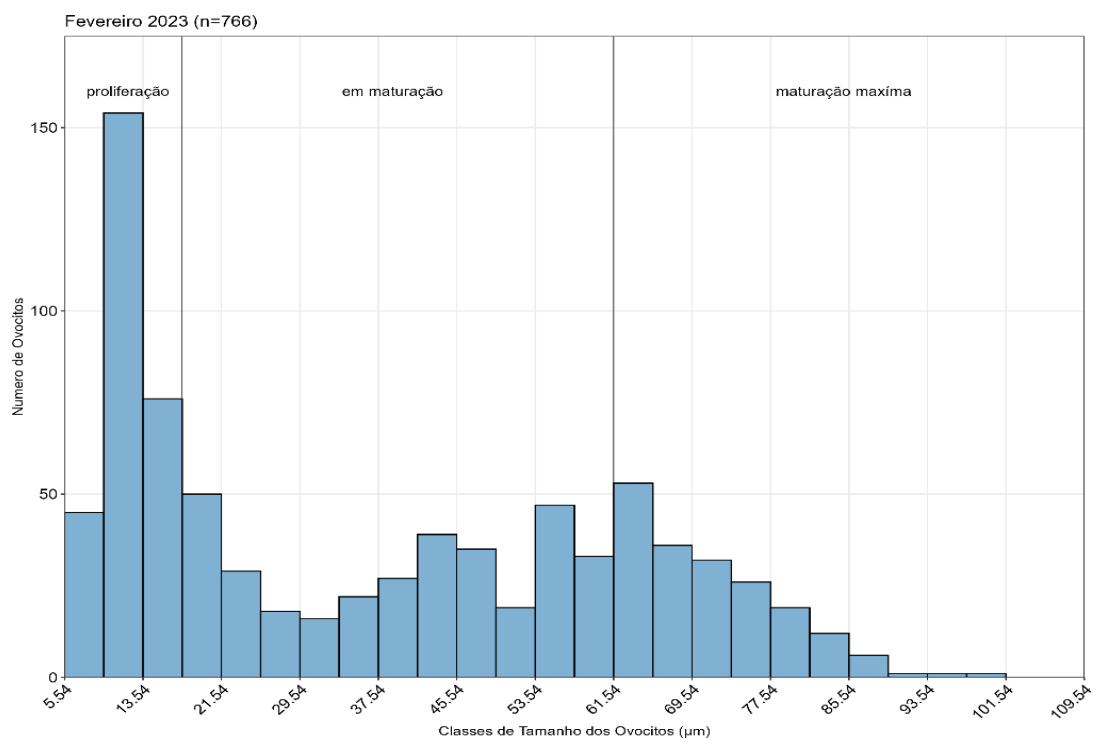


Figura 10 – Distribuição da frequência do diâmetro médio dos ovócitos de *Holothuria (Halodeima) grisea* durante o verão de 2023, na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. As linhas verticais indicam os limites entre as classes associadas aos diferentes estágios de desenvolvimento ovocitário

4. DISCUSSÃO

Condição reprodutiva de Holothuria (Halodeima) grisea

Entre os períodos analisados foram observadas mudanças nas condições reprodutivas dos indivíduos da população de Armação de Itapocoroy. A expressiva presença de gônadas em amadurecimento e maturação na primavera (novembro de 2022) reforça informações pretéritas que consideram a estação um período preparatório do ciclo reprodutivo, caracterizado por investimento energético para o crescimento celular e vitelogênese (nas fêmeas) antes da eliminação maciça dos gametas no verão (BUENO et al., 2015; LEITE-CASTRO et al., 2016; MIRANDA *et al.*, 2025; TAVARES et al., 2025).

Por sua vez no final da estação subsequente (março de 2023) a maior parte dos organismos encontravam-se eliminando seus gametas ou já no final desse processo, e a presença de indivíduos indeterminados (classificados como esgotados) aponta para sinais de exaustão da atividade reprodutiva (MEZALI et al., 2014; BUENO *et al.*, 2015; LEITE-CASTRO, 2016).

Processos de reabsorção das gônadas que inviabilizam a diferenciação sexual sucedendo ou concomitantes ao estágio pós-desova são comuns dentre os Aspidochirotida (RAMOFAFIA *et al.*, 2000; RASOLOFONIRINA *et al.*, 2005; GAUDRON *et al.*, 2008; ARSAD *et al.*, 2017).

Deste modo reitera-se que o maior (senão o mais importante) período reprodutivo de *H. (H.) grisea* nesse trecho da costa catarinense ocorreu entre dezembro a fevereiro. Na avaliação pretérita (2019 e 2020) da mesma população feita por Tavares *et al.* (2025) a atividade se prolongou até maio e portanto especula-se a existência de pequenas variações interanuais na extensão (mas não na periodicidade), possivelmente modulado por fatores ambientais como a disponibilidade trófica (recursos energéticos) (MARQUET *et al.*, 2017; VENANCIO *et al.*, 2022).

Esse cenário pode justificar também diferenças no *fitness* individual, quando observados os registros de comprimento total e peso úmido total (menores) e participação em peso das gônadas (maiores) no período anterior (2019 e 2020), o que sugere compromissos de transferência de recursos (*trade-offs*) entre os compartimentos somático e o reprodutivo (BENÍTEZ-VILLALOBOS *et al.*, 2013, AVILA-POVEDA *et al.*, 2022).

Análises macroscópicas – cor e dimensão dos túbulos gonadais

A coloração das gônadas dos holoturoides é amplamente utilizada como ferramenta macroscópica preliminar da sexagem e do estado reprodutivo dos indivíduos. As relações observadas entre coloração dos túbulos, maturidade do órgão e sexo (gônadas femininas predominantemente rosadas e masculinas em tons bege ou creme) corroboram os padrões descritos para o gênero *Holothuria* (DESPALATOVI *et al.*, 2004; BUENO *et al.*, 2015; LEITE-CASTRO *et al.*, 2016; ARSAD *et al.*, 2017; RUPP *et al.*, 2021).

A maior homogeneidade nos padrões de coloração do órgão coincidem com momentos no ano de grande sincronia no desenvolvimento gonadal entre indivíduos e sexos (DESPALATOVI *et al.*, 2004; BUENO *et al.*, 2015; LEITE-CASTRO *et al.*, 2016; TAHRI *et al.*, 2019; TAVARES *et al.*, 2025). NO presente estudo a diversidade cromática na primavera — especialmente entre as fêmeas — revela a coexistência de diferentes estágios gametogênicos na população, em oposição ao final do verão.

Apesar de sua utilidade para triagens em campo, a coloração gonadal apresenta limitações evidentes, sobretudo nos períodos de maior heterogeneidade reprodutiva (MARQUET *et al.*

2017; MIRANDA e TAVARES, 2024; MIRANDA et al., 2025.) e se utilizada de forma isolada (PASQUINI *et al.*, 2022). Contudo essas observações visuais não devem ser descartadas, mas sim aprimoradas. O uso de equipamentos como o colorímetro digital (sistema CIELAB) foi proposto por Pasquini et al. (2019) e a padronização por meio de escalas cromáticas existentes foram sugeridas por Miranda e Tavares (2024) e Miranda *et al.* (2025) e podem assim reduzir a subjetividade da classificação visual. Quando associada as descrições microscópicas e ao índice gonadossomático, as descrições de cores dos túbulos gonadais dos pepinos-do-mar desempenha papel relevante como ferramenta inicial de triagem, especialmente em estudos aplicados ao manejo de populações naturais e cultivo (RUPP *et al.*, 2021; TAVARES *et al.*, 2025).

Outra métrica usual em holoturoídeos é a determinação das dimensões macroscópicas dos túbulos gonadais (p. ex. espessura ou diâmetro e comprimento); descrições sobre o arranjo anatômico (padrão de ramificação ou dicotimização) são indicadores estruturais do desenvolvimento reprodutivo e informações quanto a consistência e opacidade também agregam elementos (ainda que subjetivos) para um panorama mais detalhado da condição reprodutiva dos indivíduos (MUTHIGA et al., 2009; BENÍTEZ-VILLALOBOS *et al.*, 2013; BUENO *et al.*, 2015; LEITE-CASTRO *et al.*, 2016; MIRANDA *et al.*, 2025).

Importante salientar que uma das principais limitações na determinação do comprimento dos túbulos é a variabilidade no padrão de crescimento dos túbulos (Modelo de Recrutamento de Túbulos em SMILEY, 1988) descritos para algumas espécies de holoturoídeos. Segundo alguns autores a detecção de células germinativas é dependente do tamanho do túbulo (HAMEL et al., 1993; RASOLOFONIRINA et al., 2005; MERCIER e HAMEL, 2009; DEMEULDRE e EECKHAUT, 2012) e a absorção ou não dos túbulos gonadais após a eliminação de gametas podem gerar interpretações errôneas (ASHA e MUTHIAH, 2008; GAUDRON *et al.*, 2008; MARQUET *et al.*, 2017; MIRANDA *et al.*, 2025; TAVARES *et al.*, 2025)

De modo geral as maiores dimensões estão associadas aos estágios de maturação e emissão de gametas e os menores a pós-desova. Dimensões intermediárias a grandes também podem ser registradas em estágios de recuperação e início da gametogênese onde processos de alocação de recursos contribuem para o maior desenvolvimento da parede tubular (CARBONI *et al.*, 2013; TAVARES e MIRANDA, 2024; MIRANDA *et al.*, 2025). Diferenças entre sexos e as dimensões dos túbulos variam entre espécies, sendo comum registros túbulos femininos maiores, como provável resposta a elevada demanda energética em prol da oogênese

(RASOLOFORINA *et al.*, 2005; BAHIDA *et al.*, 2022; MIRANDA e TAVARES 2024; TAVARES *et al.*, 2025).

Para *H. (H.) grisea* as dimensões dos túbulos (diâmetro ou espessura) descritas no presente estudo (Santa Catarina), por LEITE-CASTRO *et al.*, 2016 e MIRANDA *et al.*, 2025 (Paraná) (Ceará) diferenciam grosseiramente na métrica utilizada, o que evidencia a necessidade de padronização para que comparações sejam possíveis entre as populações no país.

Nos resultados do presente estudo a ausência de interação entre sexo e estação do ano com relação ao diâmetros dos túbulos gonadais de *H. (H.) grisea* reforça a interpretação de que embora seja uma ferramenta sensível para indicar o grau de desenvolvimento gonadal deve interpretada de forma integrada à análise histológica (SANTOS *et al.*, 2015; RAMOS-MIRANDA *et al.*, 2017 TAVARES *et al.*, 2025), atuando como parâmetro complementar na caracterização do ciclo reprodutivo pelo menos nessa espécie.

Índices fisiológicos – Índice gonadossomático ou gonadossomático (IG ou IGS)

A avaliação do índice representa uma ferramenta corriqueira nos estudos de reprodução dos equinodermos e muitas vezes utilizada exclusivamente para inferir padrões sazonais de investimento gonadal e sincronização reprodutiva (TAVARES e BORZONE, 2006; MUTHIGA *et al.*, 2009). Apesar de sua ampla utilização nos holoturoides (GAUDRON *et al.*, 2008; DISSANAYAKE e STEFANSSON, 2010; ARSAD *et al.*, 2017; ROGERS *et al.*, 2018; TOLON e EUGIN, 2019; BAHIDA *et al.*, 2022), o índice é fortemente influenciado pelo peso hídrico corporal, estado nutricional dos indivíduos e processos de recuperação das gônadas (DRUMM e LONERAGAN, 2005; RASOLOFORINA *et al.*, 2005; BENÍTEZ-VILLALOBOS *et al.*, 2013). A maioria dos autores recomenda a sua interpretação associada as descrições microanatômicas do tecido gonadal (RASOLOFORINA *et al.*, 2005; BENÍTEZ-VILLALOBOS *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2015; BAHIDA *et al.*, 2022; TAVARES *et al.*, 2025).

Uma solução bastante usual na literatura é que a participação das gônadas sobre o peso animal seja calculada em relação ao peso úmido (ou desidratado) da parede corporal, o maior compartimento das holoturias, considerado um parâmetro bastante confiável para o tamanho dos organismos (RAMOFAFIA *et al.*, 2000; RASOLOFORINA *et al.*, 2005; MUTHIGA *et al.*, 2009; DISSANAYAKE e STEFANSSON 2010) eliminado assim possíveis distorções quanto à interpretação do esforço reprodutivo.

No presente estudo as variações do índice analisadas considerando desenvolvimento gonadal *versus* o Peso Total (IGPT) e o peso da parede do Corpo (IGPC) evidenciaram a influência sazonal das ferramentas sobre o desenvolvimento das gônadas. Ambos os índices apresentaram valores significativamente mais elevados na primavera (correspondendo ao acúmulo de reservas e células no período pré-emissão de gametas) e com quedas acentuadas no verão, com a liberação dos gametas sucedida pela exaustão da condição reprodutiva, padrão confirmado para demais congêneras (MUTHIGA *et al.*, 2009; DISSANAYAKE e STEFANSSON, 2010; ARSAD *et al.*, 2017).

Na comparação entre denominadores (Peso Total vs. Parede do Corpo) a superioridade numérica do IGPC evidencia sua maior sensibilidade à biomassa gonadal por isolar o peso somático estrutural (parede do corpo) das variações causadas por fluidos celomáticos e conteúdos digestivos - componentes do peso total realçadas ainda por mudanças sazonais no comportamento e metabolismo animal (RASOLOFORINA *et al.*, 2005; MUTIGA *et al.*, 2009; LEITE-CASTRO *et al.*, 2016). Nos resultados obtidos por Tavares *et al.* (2025) para a mesma população nenhuma mudança significativa nos dois índices foi associada aos eventos gametogênicos, nem observada qualquer interação entre sexo ou meses, o que reforça a ideia sobre variabilidade individual e interanual e reiterando novamente a necessidade de combinação de métodos nos estudos sobre reprodução do grupo.

Análises microscópicas – estágios de desenvolvimento gonadal, índice (score) de maturidade e citometria dos gametas femininos.

A validação histológica para a descrição e categorização dos eventos (e estágios) gametogênicos e aspectos microanatômicos dos túbulos gonadais são as mais importantes ferramentas de análise das condições reprodutivas dos holoturoides e devem sempre acompanhar as análise macroscópicas, menos robustas (LEITE-CASTRO, 2016; RASOLOFORINA *et al.*, 2005; BUENO *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2018; ROGERS *et al.*, 2018; TAVARES *et al.*, 2025). Ademais configuram-se como técnicas que pormenorizam aspectos teciduais e celulares, como o grau de repleção do lúmen dos túbulos, a presença de células somáticas (fagocitárias), o crescimento e amadurecimento das células germinativas (gametas). Tais processos recebem terminologias um pouco diversificadas entre os autores, principalmente no detalhamento das fases iniciais e finais do ciclo reprodutivo (RASOLOFORINA *et al.*, 2005; BUENO *et al.*, 2015; ROGERS *et al.*, 2018; LEITE-CASTRO *et al.*, 2016; PASQUINI *et al.*, 2022; TAVARES *et al.*, 2025).

As descrições dos eventos gametogênicos de *H. (H.) grisea* observados no presente estudo (primavera e verão) evidenciaram a variação sazonal. Para a determinação dos indivíduos indeterminados as análises histológicas são fundamentais e detalham melhor o período pós-desova (GHOBADYAN *et al.*, 2012; MEZALI *et al.*, 2014; MARQUET *et al.*, 2017). Uma métrica complementar a categorização dos estágios desenvolvimento gonadal histológicas é o cálculo do *status* de maturidade animal ou Índice de Maturidade (IM), realizado após um escalonamento dos estágios onde os maiores *scores* são dados aos estágios finais do ciclo reprodutivo (emissão e pós-desova) indicando o ápice do fenômeno ao longo do ano (RASOLOFORINA *et al.*, 2005; BENÍTEZ-VILLALOBOS *et al.*, 2013; ARSAD *et al.*, 2017). Na comparação entre os resultados do presente estudo e os dados pretéritos (Tavares *et al.*, 2025) confirma-se o verão como a estação de maior condição reprodutiva para a população de Armação de Itapocoroy.

Por fim, as informações quali-quantitativas geradas nas avaliações citométricas da dimensão dos gametas femininos além de fornecer dados numéricos sobre a evolução temporal da oogênese é palco investigativo sobre esforço parental e a qualidade do ovócito feminino em equinodermos, inferindo importantes argumentações sobre as estratégias de história de vida, como taxas de fecundidade, sobrevivência e sucesso larval (MORAN *et al.*, 2013; RAKAJ *et al.*, 2018). Para o gênero *Holothuria* a biometria do gameta feminino tem sido útil nas comparações entre populações (BUENO *et al.*, 2015; LEITE-CASTRO *et al.*, 2016, TAVARES *et al.*, 2025) e as congêneres (RASOLOFORINA *et al.*, 2005; ASHA e MUTHIAH, 2008; NAVARRO *et al.*, 2012; BENÍTEZ-VILLALOBOS *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2018; ROGERS *et al.*, 2018).

De acordo com Tavares *et al.*, (2025) uma importante ressalva sobre medições citométricas está no fato de que as realizadas a fresco (*in vitro*) fornecem dimensões distintas daquelas observadas em preparados histológicos, uma vez que a retração do volume celular após as técnicas de fixação, hidratação, desidratação e diafanização comprometem comparações exequíveis. Na população de Armação do Itapocoroy, sob condições experimentais Rupp *et al.* (2021) registrou ovócitos vitelogênicos frescos de 135,8 μ m (\pm 6,7 μ m) contrastando aos menores valores observados nas preparações histológicas de Tavares *et al.* (2025) (entorno de 80 μ m) e no presente estudo (máximo de 105,68 μ m).

Não obstante a avaliação da oogênese no presente estudo confirma um padrão bimodal na distribuição do diâmetro médio dos ovócitos; a presença de diferentes coortes ao longo do ciclo

reprodutivo é um padrão comumente observado em espécies com reprodução contínua ou parcialmente contínua (RASOLOFORINA *et al.*, 2005; BENÍTEZ-VILLALOBOS *et al.*, 2013; BUENO *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015; LEITE-CASTRO, 2016; PASQUINI *et al.*, 2022). A predominância de ovócitos em vitelogênese na primavera indica acúmulo de reservas no período que antecede a maturidade máxima enquanto que ao final do verão a redução em número e dimensões celulares evidenciam a ocorrência do evento de liberação dos gametas. Reitera-se aqui a elevada sensibilidade da citometria para a caracterização da dinâmica reprodutiva dessa espécie (TAVARES *et al.*, 2025).

Como síntese desta discussão o quadro I a seguir reúne as informações nas duas últimas décadas sobre as ferramentas utilizadas em análises macro e microscópicas nos estudos sobre reprodução no gênero *Holothuria* e no quadro II são apresentadas as terminologias utilizadas nos estágios de desenvolvimento gonadal. Notadamente é observado a preferência dos autores pela combinação de métodos e as ferramentas mais validadas estão associadas ao melhor desempenho (maior sensibilidade e elevado grau de assertividade) na avaliação crítica dos múltiplos contextos da reprodução desse grupo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação integrada de múltiplas ferramentas para análise da condição reprodutiva demonstrou-se fundamental para a compreensão abrangente da dinâmica reprodutiva de *Holothuria (Halodeima) grisea*. Os resultados obtidos nas estações mais quentes consolidam a primavera como período estratégico de preparação reprodutiva, marcado por intenso crescimento celular, vitelogênese e amadurecimento gonadal, enquanto o verão se estabelece como o principal intervalo de emissão gamética, seguido por reorganização estrutural e reabsorção parcial dos túbulos gonadais. Ainda que o padrão sazonal seja consistente, as diferenças observadas entre anos indicam que a extensão temporal dos eventos reprodutivos pode ser modulada por variáveis ambientais e por respostas fisiológicas individuais, refletindo ajustes adaptativos relacionados ao fitness.

No âmbito metodológico, os resultados reforçam que abordagens macroscópicas, embora amplamente utilizadas, apresentam limitações inerentes quando aplicadas de forma isolada. A avaliação visual da coloração dos túbulos gonadais constitui ferramenta prática e operacionalmente vantajosa em triagens de campo, especialmente durante períodos de máxima maturidade, quando a sincronia populacional reduz a ambiguidade interpretativa. Contudo, sua subjetividade impõe restrições analíticas significativas. Nesse sentido, a incorporação de

escalas cromáticas padronizadas e de instrumentos como colorímetros representa avanço metodológico necessário para elevar a reprodutibilidade e comparabilidade dos dados.

De maneira semelhante, as análises biométricas dos túbulos gonadais (espessura, diâmetro e comprimento) revelam sensibilidade ao estágio de desenvolvimento gonadal, mas não estão isentas de limitações. O padrão de crescimento tubular, a dicotomização, os processos de recrutamento e reabsorção pós-desova e a elevada variabilidade interespecífica podem comprometer interpretações. Assim, embora informativas, tais métricas devem ser compreendidas como indicadores complementares, e não como critérios diagnósticos absolutos da condição reprodutiva.

O Índice gonadossomático demonstra sensibilidade às variações sazonais do desenvolvimento gonadal, sendo o índice baseado no peso da parede corporal (IGPC) mais consistente ao minimizar interferências do peso hídrico e do conteúdo digestivo metodologicamente. Sua maior sensibilidade à biomassa reforça a recomendação de sua adoção prioritária em estudos futuros, sobretudo quando o objetivo envolve comparações sazonais ou interanuais mais refinadas.

Em contrapartida, as abordagens microscópicas consolidam-se como o eixo central e mais robusto da avaliação reprodutiva. A histologia permite a identificação inequívoca dos estágios gametogênicos, e o detalhamento das transformações microanatômicas. O índice de maturidade (IM) e a citometria dos ovócitos ampliaram a precisão das interpretações, evidenciando padrão bimodal de desenvolvimento e alta sensibilidade na detecção das fases de acúmulo e liberação de gametas.

De forma geral, os resultados reforçam que a combinação de métodos macro e microscópicos constitui a estratégia mais confiável para a caracterização da condição reprodutiva de *H. (H.) grisea*. A padronização metodológica e a integração de ferramentas quantitativas e qualitativas são essenciais para fortalecer comparações interanuais, subsidiando estratégias de manejo, conservação e eventual cultivo da espécie no litoral brasileiro.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAZEK, F. A.; ABDEL-RAHMAN, S. H.; EL-SHIMY, N. A.; OMAR, H. A. Reproductive biology of the tropical sea cucumber *Holothuria atra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Red Sea coast of Egypt. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 31, n. 2, p. 383-402, 2005.

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.

AQUINO-SOUZA, R.; GOMES-FILHO, J. G. F. Where are the juveniles of the gray sea cucumber *Holothuria (Halodeima) grisea*? **Latin American Journal of Aquatic Research**, Valparaíso, v. 51, n. 2, p. 316-323, 2023.

ARSAD, N. A.; OTHMAN, R.; MUHAMAD-SHALEH, S. R.; ABDU-LLAH, F. C., MATSUMOTO; M. M., MUSTAFA, S.; & SENOO, S. Reproductive pattern of sea cucumber, *Holothuria scabra* at two different sites in Sabah, Malaysia. **Journal of Natural Sciences Research**, 7(20), 67–78, 2017.

ASHA, P. S.; MUTHIAH, P. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria spinifera* (Echinodermata: Holothuroidea) from Tuticorin, Tamil Nadu, India. **Aquaculture International**, v. 16, p. 231-242, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10499-007-9140-z>.

AVILA-POVEDA, O. H. *et al.* Maximum gonad investment of the sexes of the broadcast-spawning sea cucumber *Holothuria (Halodeima) inornata* (Echinodermata: Holothuroidea). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Cambridge, v. 102, n. 1-2, p. 99-111, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0025315421000873>.

BAHIDA, A.; BENMOKHTAR, S.; AMAR, M.; KHERCHOUCHE, Y. Reproductive activity of three sea cucumber species *Holothuria forskali*, *Holothuria sanctori* and *Holothuria tubulosa* in the WSW Alboran Sea, M'diq Bay, Morocco. **Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries**, v. 26, n. 4. p. 177-196, 2022.

BAIXO, E. H. S. **Identificação da vulnerabilidade da linha de costa catarinense a episódios de alta energia com base no modelo InVEST**. 2015. 67 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Oceanografia) – Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

BENITEZ-VILLALOBOS, F.; AVILA-POVEDA, O. H.; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, I. S. Biologia reprodutiva de *Holothuria fuscocinerea* (Echinodermata: Holothuroidea) de Oaxaca, México. **Sexualidad y desarrollo inicial en organismos acuáticos**, v. 1, p. 13–24, 2013.

BENITEZ-VILLALOBOS, F.; AVILA-POVEDA, O. H.; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, I. S. Biologia reprodutiva de *Holothuria fuscocinerea* (Echinodermata: Holothuroidea) de Oaxaca, México. In: [NOME DO EDITOR, se houver]. **Sexualidad y desarrollo inicial en organismos acuáticos**. v. 1. p. 13-24, 2013.

BHATTACHARYA, P. K. Efficient estimation of a shift parameter from grouped data. **Annals of Mathematical Statistics**, v. 38, n. 6, p. 1770–1787, 1967.

BUENO, M. L.; RODRIGUES, A. R.; PRATA, J. **Guia ilustrado dos Echinodermata da porção sul do Embaiamento Sul-Brasileiro**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2018.

BUENO, M. L.; TAVARES, Y. A. G.; DI DOMENICO, M.; BORGES, M. Gametogenesis and organ weight changes of the sea cucumber *Holothuria (Halodeima) grisea* (Aspidochirotida: Holothuriidae) in southern Brazil. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 63, n. 2, p. 285-296, 2015

CARBONI, S.; HUGHES, A. D.; ATACK, T.; TOCHER, D. R.; MIGAUD, H. Fatty acid profiles during gametogenesis in sea urchin (*Paracentrotus lividus*): effects of dietary inputs on gonad, egg and embryo profiles. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 164, n. 2, p. 376-382, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.11.010>.

CONAND, C.; BYRNE, M. A Review of Recent Developments. **Marine fisheries review**, v. 55, n. 1, 1993.

DEMEULDRE, M.; EECKHAUT, I. Gonad development in the sea cucumber *Holothuria scabra* Jaeger, 1833. **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, n. 32, p. 15–23, 2012.

DISSANAYAKE, D. C. T.; STEFANSSON, G. Reproductive biology of the commercially important sea cucumber *Holothuria atra* (Holothuroidea: Aspidochirotida) in the coastal waters of northwestern Sri Lanka. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 54, n. 2, p. 65-76, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1080/07924259.2010.9652311>.

DRUMM, D. J.; LONERAGAN, N. R. Reproductive biology of *Holothuria leucospilota* in the Cook Islands and the implications of traditional gonad fishing on the population. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 39, n. 1, p. 141-146, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/00288330.2005.9517297>.

GAUDRON, S. M.; KOHLER, S. A.; CONAND, C. Reproduction of the sea cucumber *Holothuria leucospilota* in the Western Indian Ocean: biological and ecological aspects. **Invertebrate Reproduction & Development**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 19-31, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1080/07924259.2008.9652253>.

GHOBADYAN, F.; MOROVVATI, H.; GHAZVINEH, L.; TAVASSOLPOUR, E. An investigation of the macroscopic and microscopic characteristics of gonadal tubules in the sea cucumber *Holothuria leucospilota* (Persian Gulf, Iran). **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, Noumea, v. 32, p. 6-14, 2012.

GUISADO, C.; CARRASCO, S. A.; DÍAZ-GUISADO, D.; MALTRAIN, R.; ROJAS, H. Embryonic development, larval morphology and juvenile growth of the sea cucumber *Athyonidium chilensis* (Holothuroidea: Dendrochirotida). **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, Valparaíso, v. 47, n. 1, p. 65-73, 2012.

HAMEL, J.-F.; HIMMELMAN, J. H.; DUFRESNE, L. Gametogenesis and spawning of the sea cucumber *Psolus fabricii* (Duben and Koren). **The Biological Bulletin**, Chicago, v. 184, n. 2, p. 125-143, 1993. DOI: <https://doi.org/10.2307/1542223>.

HUANG, W., HUO, D., YU, Z., REN, C., JIANG, X., LUO, P., CHEN, T., HU, C. Spawning, larval development and juvenile growth of the tropical sea cucumber *Holothuria leucospilota*. **Aquaculture**, v. 488, p. 22-29, 2018.

KASAI, T. Lipid content and fatty acid composition of total lipid of sea cucumber *Stichopus japonicus* and Konowata (salted sea cucumber viscera). **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 23, n. 1, p. 45-48, 1976.

LEITE-CASTRO, LV, DE SOUZA-JUNIOR, J., SALMITO-VANDERLEY, CSB, FERREIRA-NUNES, J., HAMEL, JF, & MERCIER, A. Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria grisea* in Brazil: importance of social and environmental factors in breeding coordination. **Marine Biology**, [S. l.], v. 163, n. 67, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2865-2>.

MARQUES, D. F. **Crescimento, sobrevivência e desenvolvimento larval do pepino-do-mar *Holothuria grisea*: alimentação com diferentes microalgas**. 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

MARQUET, N.; CONAND, C.; POWER, D. M.; CANÁRIO, A. V. M.; GONZÁLEZ-WANGÜMERT, M. Sea cucumbers, *Holothuria arguinensis* and *H. mammata*, from the southern Iberian Peninsula: variation in reproductive activity among populations from different habitats. **Fisheries Research**, v. 191, p. 120–130, 2017.

MARTINS, L. R. **Estudo taxonômico dos Holothuroidea (Echinodermata) de águas rasas da costa brasileira**. 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado em Diversidade Animal) – Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

MARTINS, L. R.; TAVARES, Y. A. G.; VASCONCELOS, Y. N.; SANCHEZ, F. J. R.; GUILHERME, P. D. B.; RUPP, G. S.; SOUTO, C. A. **Brazil's Silent Role in the Illegal Sea Cucumber Trade**. SSRN, 2025. DOI: <https://doi.org/10.2139/ssrn.5295582>..

MENDES, F. M.; CACCIATORI-MARENZI, A. W.; DI DOMENICO, M. Population patterns and seasonal observations on the density and distribution of *Holothuria grisea* (Holothuroidea: Aspidochirotida) on the coast of Santa Catarina, Brazil. **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, Nouméa, n. 23, p. 5-16, 2006.

MERCIER, A.; HAMEL, J.-F. Endogenous and exogenous control of gametogenesis and spawning in echinoderms. **Advances in Marine Biology**, London, v. 55, p. 1-302, 2009. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(09\)55001-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(09)55001-8).

MEZALI, K.; SOUALILI, D. L.; NEGHLI, L.; CONAND, C. Reproductive cycle of the sea cucumber *Holothuria (Platyperona) sanctori* (Holothuroidea: Echinodermata) in the southwestern Mediterranean Sea: interpopulational variability. **Invertebrate Reproduction &**

Development, [S. l.], v. 58, n. 3, p. 179-189, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1080/07924259.2014.883337>.

MIRANDA, M. P.; SEMANOVSKI, N. P.; TAVARES, Y. A. G. Gonad development and gonad fatty acid composition of *Holothuria (Halodeima) grisea* (Echinodermata: Holothuroidea) in Southern Brazil: new perspectives. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 200-216, 2025. DOI: <https://doi.org/10.54451/PanamJAS.20.3.200>

MIRANDA, M. P.; TAVARES, Y. A. G. Biochemical and ecological components of *Holothuria (Halodeima) grisea* Selenka, 1867 (Echinodermata: Holothuroidea). **Regional Studies in Marine Science**, [S. l.], v. 73, p. 103460, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2024.103460>.

MORAN, A. L.; MCALISTER, J. S.; WHITEHILL, E. A. G. Eggs as energy: revisiting egg size scaling and energy content among echinoderms. **Biological Bulletin**, [S. l.], v. 224, n. 3, p. 184-191, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1086/BBLv224n3p184>.

MUTHIGA, N. A.; KAWAKA, J. A.; NDIRANGU, S. The timing and reproductive output of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* on the Kenyan coast. **Estuarine, Coastal and Shelf Science** v.8, p. 353-360, 2009.

MUTHIGA, N. A.; KAWAKA, J. The effects of temperature and light on gametogenesis and spawning of four sea urchin species and one sea cucumber species on coral reefs in Kenya. In: INTERNATIONAL CORAL REEF SYMPOSIUM, 11., 2008, Fort Lauderdale. **Proceedings** [...]. Fort Lauderdale: ICRS, 2008. p. 356-360.

NAVARRO, P. G.; GARCIA-SANZ, S.; TUYA, F. Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria sanctori* (Echinodermata: Holothuroidea). **Scientia Marina**, v. 76, n. 4, p. 741-752, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3989/scimar.03669.10A>.

OLIVEIRA, S. **Alternative conceptions and biology teaching**: how to use differentiated strategies in the initial formation of graduated. Curitiba: Editora UFPR, 2005.

PASQUINI, V., PORCU, C., MARONGIU, MF, FOLLESA, MC, GIGLIOLI, AA, ADDIS, P. New insights into the reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria tubulosa*

(Echinodermata, Holothuroidea) in the Mediterranean: implications for management and domestication. **Frontiers in Marine Science**, [S. l.], v. 9, art. 1029147, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1029147>

PONTE, I. A. R. **A pesca, processamento artesanal e qualidade microbiológica do produto final do pepino-do-mar *Holothuria grisea* Selenka, 1867 (Echinodermata: Holothuroidea) no extremo litoral oeste do Ceará.** 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

PONTE, I. A. R.; FEITOSA, C. V. Evaluation of an unreported and unregulated sea cucumber fishery in eastern Brazil. **Ocean & Coastal Management**, v. 167, p. 1–8, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2018.09.016>

PRATA, J.; CHRISTOFFERSEN, M. L. Current knowledge of Holothuriida (Holothuroidea: Echinodermata) from Brazil. **Frontiers in Marine Science**, [S. l.], v. 11, art. 1333253, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1333253>.

PURCELL, S.W., LOVATELLI, A., GONZALEZ WANGUEMERT, M., SOLIS MARIN, F. A., SAMYN, Y., CONAND, C. **Sea cucumbers of commercial importance worldwide.** Rome: FAO, 2023. (FAO Species Catalogue for Fishery Purposes, n. 6, Rev. 1).

RAKAJ, A.; FIANCHINI, A.; BONCAGNI, P.; SCARDI, M.; CATAUDELLA, S. Artificial reproduction of *Holothuria polii*: a new candidate for aquaculture. **Aquaculture**, [S. l.], v. 498, p. 444-453, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.060>.

RAMÍREZ-GONZÁLEZ J, MOITY N, ANDRADE-VERA S AND REYES H. Overexploitation and more than a decade of failed management leads to no recovery of the Galápagos sea cucumber fishery. **Frontiers in Marine Science**, [S. l.], v. 7, art. 554314, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.554314>.

RAMOFAFIA, C.; BATTAGLENE, S. C.; BELL, J. D.; BYRNE, M. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in the Solomon Islands. **Marine Biology**, Berlin, v. 136, n. 6, p. 1045-1056, 2000.

RAMOS-MIRANDA, J. *et al.* Growth and mortality of the sea cucumber *Holothuria floridana* in the southern Gulf of Mexico. **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, Nouméa, n. 37, p. 55-58, mar. 2017.

RASOLOFONIRINA, R., VAÏNTILIGON, D., EECKHAUT, I., & JANGOUX, M. Reproductive cycle of edible echinoderms from the southwestern Indian Ocean. II: the sandfish *Holothuria scabra*. **Journal of Western Indian Ocean Marine Sciences**, 4(1), 61-75, 2005.

ROBINSON, G.; LOVATELLI, A. Global sea cucumber fisheries and aquaculture: FAO's inputs over the past few years. **FAO Aquaculture Newsletter**, Rome, n. 53, p. 55-57, 2015.

ROGERS, A.; HAMEL, J.-F.; MERCIER, A. Population structure and reproductive cycle of the commercial sea cucumber *Holothuria mexicana* (Echinodermata: Holothuroidea) in Belize. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 66, n. 4, p. 1629-1648, 2018. DOI: <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i4.31610>.

RUPP, G. S.; COSTA, R. C. da; MARENZI, A. W. C.; MANZONI, G. C.; SILVA, I. S. Reprodução e larvicultura de *Holothuria (H.) grisea* Selenka, 1867 (Holothuroidea: Aspidochirotida) em laboratório: resultados iniciais no sul do Brasil. **AquaTechnica**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 133-143, 2021.

RUPP, G. S.; MARENZI, A. W. C.; SOUZA, R. V. de; SCHROEDER, R. Levantamento populacional de *Holothuria (Halodeima) grisea* (Aspidochirotida: Holothuriidae) em seu limite de distribuição geográfica no Atlântico Sul Ocidental. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 72, n. esp. 1, art. e58623, 2024. DOI: <https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop.v72is1.58623>.

SANTOS, R.; DIAS, S.; PINTEUS, S.; SILVA, J.; ALVES, C.; TECELÃO, C.; PEDROSA, R.; POMBO, A. Sea cucumber *Holothuria forskali*, a new resource for aquaculture? Reproductive biology and nutraceutical approach. **Aquaculture Research**, [S. l.], v. 47, n. 7, p. 2307-2323, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/are.12683>.

SINGH, R.; MACDONALD, B. A.; LAWTON, P.; THOMAS, M. L. H. The reproductive biology of the dendrochirote sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea) using new quantitative methods. **Invertebrate Reproduction & Development**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 111-125, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1080/07924259.2001.9652700>.

SMILEY, S. The dynamics of oogenesis and the annual ovarian cycle of *Stichopus californicus* (Echinodermata: Holothuroidea). **Biological Bulletin**, [S. l.], v. 175, n. 1, p. 79-93, 1988. DOI: <https://doi.org/10.2307/1541720>.

SONNENHOLZNER-VARAS, J. I. ¿Hacia dónde va la acuicultura de equinodermos en América Latina? Potencial, retos y oportunidades. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 69, n. 2, p. 1-18, 2021. DOI: <https://doi.org/10.15517/rbt.v69i2.45263>.

SOUZA JUNIOR, J.; PONTE, I.; COE, C. M.; FARIAS, W. R. L.; FEITOSA, C. V.; HAMEL, J.-F.; MERCIER, A. Sea cucumber fishing in Northeast Brazil. **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, Nouméa, n. 37, p. 43-47, mar. 2017.

SPARRE, P.; VENEMA, S. C. **Introduction to tropical fish stock assessment: part 1: manual**. Rome: FAO, 1997. 407 p. (FAO Fisheries Technical Paper, n. 306).

TAHRI, Y.; DERMECHE, S.; CHAHROUR, F.; BOUDERBALA, M. The reproductive cycle of the sea cucumber *Holothuria (Holothuria) tubulosa* Gmelin, 1791 (Echinodermata: Holothuroidea: Holothuriidae) on the coast of Oran, Algeria. **Biodiversity Journal**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 159-172, 2019.

TAVARES, Y. A. G.; BORZONE, C. A. Reproductive cycle of *Mellita quinquesperforata* (Leske) (Echinodermata, Echinoidea) in two contrasting beach environments. **Revista Brasileira de Zoologia**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 573-580, jun. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-81752006000200033>.

TAVARES, Y. A. G.; N. V., Y.; RUPP, G. S.; BORGES-GUILHERME, P. D.; CACCIATORI-MARENZI, A. W. Reproduction of the sea cucumber *Holothuria (Halodeima) grisea* (Holothuriida: Holothuriidae) from the coast of Santa Catarina, southern Brazil. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 73, art. e60485, 2025. DOI: <https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop.v73i1.60485>.

TOLON, M. T.; ENGIN, S. Gonadal development of the holothurian *Holothuria polii* (Delle Chiaje, 1823) in spawning period at the Aegean Sea (Mediterranean Sea). **Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 379-385, 2019.

VANZ, A.; GARBOSSA, L. H. P.; FERNANDES, L. G.; BOLL, M.; SOUZA, R. V. de; VIANNA, L. F.; RUPP, G. S. **Efeito de variáveis meteorológicas sobre o comportamento do nível do mar na costa catarinense, Brasil.** In: CONGRESSO SOBRE PLANEAMENTO E GESTÃO DAS ZONAS COSTEIRAS DOS PAÍSES DE EXPRESSÃO PORTUGUESA, 8., 2015.

VENÂNCIO, E.; FÉLIX, P. M.; BRITO, A. C.; SILVA, F. A. e; SIMÕES, T.; SOUSA, J.; MENDES, S.; POMBO, A. Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria mammata* (Echinodermata: Holothuroidea). **Biology**, Basel, v. 11, n. 5, art. 622, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology11050622>.

VERGARA-CHEN, C.; GUERRA, Z.; COLLADO, G. N. EL PEPINO DE MAR, *Isostichopus fuscus*, RECURSO MARINO EN PELIGRO CON ALTAS NECESIDADES DE MANEJO. **Tecnociencia**, v. 17, n. 2, p. 21–41, 2015.

XAVIER, L. A. R. Inventário dos equinodermos do estado de Santa Catarina, Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 73-78, 2010.