

MSc

2.^o
CICLO

FCUP
CIIMAR
2017

U. PORTO

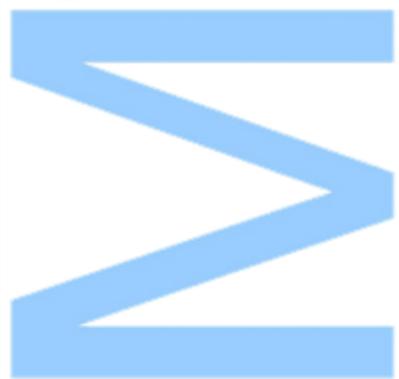
Determinação do período reprodutivo da solha das pedras (*Platichthys flesus*) no estuário do rio Douro

Diana Couto dos Santos

FC

Determinação do período reprodutivo da solha das pedras (*Platichthys flesus*) no estuário do rio Douro

Diana Couto dos Santos
Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em
Recursos Biológicos Aquáticos
2017



Determinação do período reprodutivo da solha das pedras (*Platichthys flesus*) no estuário do rio Douro

Diana Couto dos Santos

Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos

Departamento de Biologia

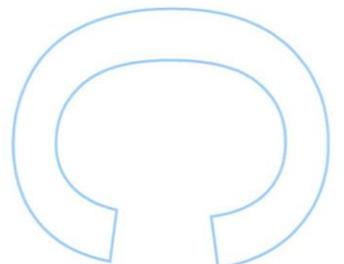
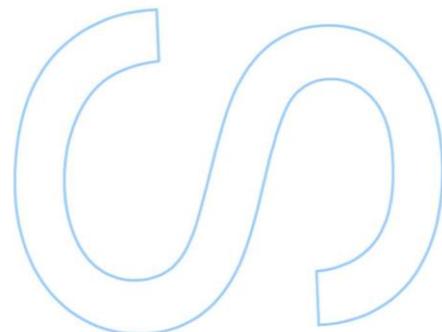
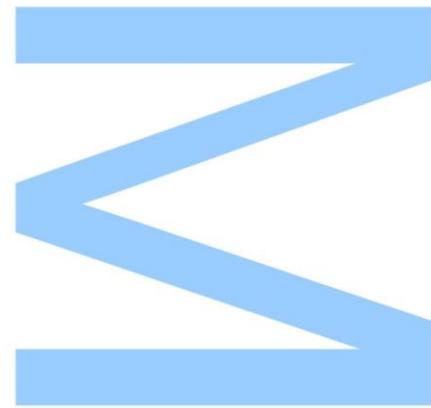
2017

Orientador

Doutora Sandra Ramos, Investigadora pós-doutoramento, CIIMAR

Coorientador

Doutora Marta Ferreira, Investigadora pós-doutoramento, Escola de Estudos Marinhos, FCTA da Universidade do Sul do Pacífico, Ilhas Fiji

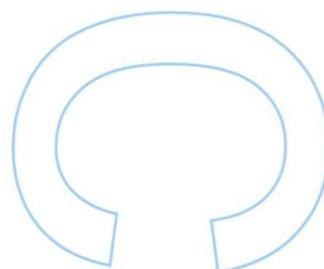
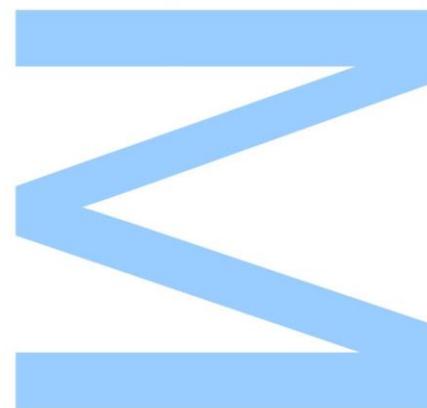




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____



Com amor e por amor, tudo é possível!

Agradecimentos

A dissertação de mestrado aqui apresentada, só foi possível devido ao empenho e dedicação de inúmeras pessoas. Como tal, gostaria de agradecer:

À minha orientadora, Doutora Sandra Ramos, e coorientadora, Doutora Marta Ferreira, por terem disponibilizado os meios necessários para a realização deste trabalho e terem contribuído para a minha formação científica e pessoal, permitindo-me adquirir as mais variadas competências;

À Doutora Vânia Freitas, agradeço a amizade, o apoio e o tempo que disponibilizou para me orientar nos trabalhos laboratoriais ao longo deste trabalho;

Ao Professor Doutor Aires Teles, coordenador de Mestrado de Recursos Biológicos Aquáticos, por sempre ter facilitado os meios necessários para realização deste mestrado;

Ao Doutor Eduardo Rocha, pela sua colaboração que foi fundamental para o estudo histológico;

À equipa do laboratório do Doutor Eduardo Rocha, principalmente à Fernanda Malhão e Célia Lopes, por todos conhecimentos de processamento de tecidos ao longo deste trabalho;

Ao Doutor Marco Preto, agradeço todo o conhecimento e orientação laboratorial no ramo da química;

À Mestre e amiga Joana Martins, agradeço toda a força e os conhecimentos que me forneceu para trabalhar com o software R ao longo deste mestrado;

Ao Mestre Diogo Silva, agradeço a amizade e o apoio que me deu ao longo deste trabalho;

A todos os elementos do CIIMAR, principalmente à Mariana Reis, Vanessa Neves, Sabrina Rodrigues e Jacinto Cunha, que de uma ou outra forma ajudaram e tornaram possível este trabalho;

Aos meus pais, à minha irmã e ao João, pelo apoio incondicional que demonstraram para comigo ao longo deste tempo, sem eles esta etapa da minha vida teria sido impossível,

A todos um Muito Obrigada!

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) através do projeto de investigação “Mytag - Integração de marcas naturais e artificiais para reconstruir migrações de peixes e alterações ontogénicas de nicho” (PTDC/MAR-EST/2098/2014), no âmbito do Projeto 9471 – Reforçar a Investigação, o Desenvolvimento Tecnológico e a Inovação (Projeto 9471-RIDTI), e participado pelo Fundo Comunitário Europeu FEDER (POCI-01-0145-FEDER-016787).

Até ao momento, deste trabalho resultou uma comunicação (poster) em reuniões científicas:

Santos, D., Ferreira, M., Freitas, V., Ramos, S. (2017). Determination of the reproductive period of the European Flounder, *Platichthys flesus*, in the Douro Estuary. IJUP –Investigação Jovem na Universidade do Porto –Projeto Pluridisciplinar, Fevereiro 2017.

Resumo

A solha das pedras (*Platichthys flesus*) é uma espécie demersal migratória, com uma ampla distribuição geográfica ao longo do Oceano Atlântico. Atualmente ainda existem muitas dúvidas sobre o seu ciclo de vida, nomeadamente o local e época de postura. Esta espécie apresenta uma postura anual que ocorre normalmente no inverno. Tipicamente, pensa-se que os adultos migram para alto-mar para desovarem, mas alguns estudos colocam a hipótese desta espécie poder posturar dentro dos estuários. Este trabalho teve como principal objetivo estudar o ciclo reprodutivo de *P. flesus* no estuário do rio Douro, ao longo de uma época de reprodução. Para tal, 30 indivíduos por mês foram recolhidos na zona baixa do estuário do rio Douro em campanhas de amostragem mensais, entre novembro de 2016 a maio de 2017; e semanais entre janeiro e março de 2017, realizadas com redes de arrasto de portas a bordo de uma embarcação de pesca profissional. No laboratório, os animais foram processados para classificar macroscopicamente (217 ovários e 50 testículos) e microscopicamente (57 ovários e 50 testículos) os estados de maturação das gónadas. A avaliação microscópica foi feita através de técnicas de histologia. Foram também avaliados três índices somáticos, nomeadamente o índice gonodossomático (IGS), hepatossomático (IHS) e o fator de condição de Fulton (K). Além disso, quantificou-se a concentração dos esteroides sexuais no plasma, mais concretamente o 17 β -estradiol (E₂) no plasma sanguíneo de 54 fêmeas e, o 11-cetotestosterona (11-KT) no plasma sanguíneo de 43 machos. Os resultados demonstraram que durante o período de estudo não foram encontradas fêmeas no estado de postura (maturação) dentro do estuário, ao contrário dos machos. A nível histológico, a época de postura começou no mês de janeiro para ambos os géneros sexuais. A nível macroscópico, a época de postura ocorreu entre dezembro e abril para as fêmeas e, para os machos, a época de postura iniciou-se no mês de janeiro. Nas fêmeas, o IGS aumentou com o início da época de postura (janeiro) e diminuiu a partir do mês de março; e aumentou com a maturação dos ovários, até ao estado de pós-postura. Nos machos, o IGS não aumentou com o início da época de postura (janeiro) e diminuiu após o estado de pré-postura (em maturação). O IHS e o K aumentaram e diminuíram com o início da época de postura das fêmeas; e ambos os índices aumentaram com a maturação dos ovários, exceto no estado de pós-postura. Nos machos, o IHS aumentou com a maturação dos testículos até ao estado de pós-postura. O K não apresentou nenhum padrão ao longo da maturação do testículo. A nível hormonal, as concentrações dos esteroides sexuais aumentaram com o início da época de postura e aumentaram gradualmente com a maturação das gónadas, para ambos os géneros sexuais, até ao estado de pós-postura. Através deste estudo verificou-se que as fêmeas não maturaram dentro do estuário, ao contrário dos machos. A classificação macroscópica da

maturação dos ovários antecipou a época de postura, em comparação com a classificação microscópica. Os machos maturaram mais cedo do que as fêmeas. Os restantes índices somáticos (IHS e K) não apresentaram um padrão temporal concordante com o início da época de postura. Por outro lado, a variação da concentração de esteroides sexuais ao longo da maturação das gónadas mostrou-se como um bom indicador potencial para determinar a época de postura desta espécie.

Palavras-chaves: *Platichthys flesus*; Estuário do rio Douro; Reprodução; 17 β -Estradiol; 11-Cetotestosterona

Abstract

The European flounder (*Platichthys flesus*) is a migratory demersal species with a wide geographical distribution along the Atlantic Ocean. There are still many questions about its life cycle, namely the location of spawning area. This specie presents an annual spawning usually during the winter. Typically, adults are thought to migrate offshore to deeper oceanic waters to spawn, although there are some studies raising the hypothesis that this specie can spawn inside the estuaries. This study had as main objective to study the reproductive cycle of flounder in the Douro river estuary. In order to accomplish the objectives, monthly diurnal campaigns were performed to collect 30 adult individuals per month, between November 2016 and May 2017, jointly with extra weekly samples of 10 individuals between January and March 2017. Fish were collected with trawl nets on board a professional fishing boat in the estuary of the river Douro. In the laboratory, the animals were processed in order to classify the development stage of gonads in both macroscopic (217 ovaries and 50 testes) and microscopic (57 ovaries and 50 testes) ways. Microscopic classification was done by histological techniques. Also, three somatic indexes gonosomatic index (GSI) and hepatosomatic index (HSI) and condition factor (K) were analysed in both sexes. In addition, the concentration of the 17 β -estradiol (E2) in the blood plasma of the 54 females and the 11-ketotestosterone (11-KT) in the blood plasma of the 43 males was quantified by Elisa Kits. The results showed that during the study period no mature females were found inside the estuary, in opposition to males. At the histological level, the spawning season started in January for both sexes. But at the macroscopic level, the spawning season differed between sexes, occurring between December and April for females, and for males the spawning season began in January. In females, IGS increased with the beginning of the spawning season (January) and decreased from the March; and increased throughout the ovarian development, except in the post-spawn stage. In males, the IGS did not increase with the beginning of the spawning season (January) and decreased after the pre-spawning state (in maturation). The concentrations of sex steroids increased with the beginning of the spawning season and also gradually increased with the development of the gonads, except in the post-spawning stages, for both sexes. Results showed that any of the flounder female analyzed were mature, indicating that females do not mature inside the estuary, contrasting with the males. The macroscopic classification of ovarian development led to an anticipation of the spawning season, in comparison with the microscopic classification. Males matured earlier than females. The other somatic indexes (IHS and K) did not present any clear pattern related with the beginning of the spawning season. Finally, the variation of the sex steroids throughout the

development of the gonads appeared to be a potencial good indicator to determine a spawning season of this species.

Keywords: *Platichthys flesus*; Douro river estuary; Reproduction; 17 β -Estradiol; 11-Ketotestosterone.

Índice

Capítulo I - Introdução	1
1.1. Introdução geral	2
1.2. Maturação das gónadas.....	3
1.2.1. Oogénese	4
1.2.2. Espermatogénese	6
1.3. Endocrinologia do ciclo reprodutivo.....	9
1.3.1. Regulação endócrina da oogénese.....	11
1.3.2. Regulação endócrina da espermatogénese	13
1.4. Ciclo de vida da solha das pedras	15
1.5. Objetivos.....	17
Capítulo II - Material e Métodos	18
2.1. Trabalho de campo	19
2.1.1. Área de estudo.....	19
2.1.2. Estratégia de amostragem	20
2.2. Trabalho laboratorial	20
2.2.1. Amostragem biológica.....	20
2.2.2. Classificação microscópica do estado de maturação das gónadas	23
2.2.2.1 Fêmeas	23
2.2.2.2. Machos	24
2.2.3. Quantificação dos esteroides sexuais	25
2.2.3.1. Metodologia da quantificação.....	25
2.3. Análise de dados	27
Capítulo III – Resultados.....	30
3.1. Fêmeas.....	31
3.1.1. Avaliação macroscópica	34
3.1.2. Avaliação microscópica.....	36
3.1.2.1. Descrição do ovário	36
3.1.2.2. Evolução mensal dos estados de maturação do ovário.....	41
3.1.2.3. Variação dos índices somáticos com os estados maturação do ovário	42
3.1.3. 17 β -Estradiol.....	44
3.2. Machos	47
3.2.1. Avaliação macroscópica	50
3.2.2. Avaliação microscópica.....	52
3.2.2.1. Descrição do testículo	52
3.2.2.2. Evolução mensal dos estados de maturação do testículo	55

3.2.2.3. Variação dos índices somáticos com os estados maturação do testículo..	57
3.2.3. 11-Cetotestosterona.....	59
3.3. Determinação da época de postura	62
Capítulo IV - Discussão	66
4.1. Época de postura.....	67
4.2. Maturação das gónadas.....	70
4.3. Índices somáticos	71
4.4. Esteroides sexuais.....	72
Capítulo V - Conclusão	73
Capítulos VI – Referências bibliográficas.....	75
Capítulo VII – Anexos	84

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Avaliação macroscópica do estado de maturação dos ovários (adptado de: Sobral, 2007).	22
Tabela 2 - Avaliação macroscópica do estado de maturação dos testículos (adptado de: Sobral, 2007).	22
Tabela 3 - Avaliação microscópica do estado de maturação dos ovários (adptado de: Janssen et al. 1995).	24
Tabela 4 - Avaliação microscópica do estado de maturação dos testículos (adptado de: Weltzien et al., 2002).	25
Tabela 5 – Intervalos do comprimento total (CT) em centímetros (cm) e do peso total (PT) em gramas (g) com as respectivas médias (Méd), desvios padrões (DP), medianas (Md) e o número de fêmeas analisadas (n) no período de estudo. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.	32
Tabela 6 – Intervalos (Min-Máx) dos índices somáticos com as respectivas médias (Méd), desvios padrões (DP) e medianas (Md) de fêmeas no período da amostragem. IGS: índice gonodossomático; IHS: índice hepatossomático; K: Fator de condição; nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.	34
Tabela 7 – Número de fêmeas e intervalos dos índices somáticos, com as respectivas médias (Méd) e desvios padrões (DP) das fêmeas nos vários estados microscópicos de maturação do ovário. IGS: índice gonodossomático (A); IHS: índice hepatossomático (B); K: Fator de condição (C); REP: Estado de Repouso, PRE: Estado pré-vitelogénico; VIT: Estado vitelogénico; VITT: Estado vitelogénico tardio; POS: Estado de pós-desova.	43
Tabela 8 – Fatores de correlação de Spearman entre a classificação microscópica dos estados de maturação dos ovários e restantes variáveis de estudo.	43
Tabela 9 – Número de fêmeas e dos intervalos (mín-máx) do 17 β -estradiol (E ₂), com as respectivas médias (méd), desvio padrão (DP) e medianas (Md) ao longo dos meses da amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.	45
Tabela 10 - Número de fêmeas e os intervalos mínimo e máximo de 17 β - estradiol (E ₂), com as respectivas médias, desvios padrões (DP) e medianas (Md) nos vários estados microscópicos de desenvolvimeto do ovário REP: Estado de Repouso, PRE: Estado pré-	

vitelogénico; VIT: Estado vitelogénico; VITT: Estado vitelogénico tardio; POS: Estado de pós-desova.	46
Tabela 11 - Fatores de correlações de Spearman entre 17β - estradiol (E_2) e restantes variáveis das fêmeas.	46
Tabela 12 - Intervalos do comprimento total (CT) em centímetros (cm) e do peso total (PT) em gramas (g) com as respectivas médias (Méd), desvios padrões (DP), medianas (Md) e o número de machos presentes (n) no período de estudo. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017.	49
Tabela 13 - Intervalos do IGS, IHS e K, com as respectivas médias (Méd), desvios padrões (DP) e medianas (Md) dos machos no período da amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017.	50
Tabela 14 - Número de machos e intervalos dos índices somáticos, com as respectivas médias (Méd), desvios padrões (DP) e medianas (Md) nos vários estados microscópicos de maturação do testículo. IGS: Índice gonodossomático; IHS: Índice hepatossomático; K: Fator de condição; PM: Estado de prematuração; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação tardia; POS: Estado de pós-postura ou regressão.	58
Tabela 15 - Fatores de correlação de Spearman entre a avaliação microscópica dos estados de maturação dos testículos e restantes variáveis de estudo.	59
Tabela 16 - Número de machos e dos intervalos mínimos (Min) e máximos (Máx) do 11-cetotestosterone (11-KT), com as respectivas médias (méd), desvio padrão (DP) e medianas (Md) ao longo dos meses da amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017.	60
Tabela 17 - Número de machos e os intervalos (Min-Máx) do 11-cetotestosterone (11-KT), com as respectivas médias (Méd), desvios padrões (DP) e medianas (Md) nos vários estados microscópicos de maturação do testículo; PM: Estado de prematuração; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação tardia; POS: Estado pós-postura ou regressão.	61
Tabela 18 - Fatores de correlações de Spearman entre 11-cetotestosterone (11-KT) e restantes variáveis dos machos.	62
Tabela 19 - Evolução mensal da proporção do número de fêmeas e de machos no estado de pré-postura ou postura e pós-postura, através da classificação microscópica dos estados de maturação das gónadas. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.	63
Tabela 20 - Evolução mensal da proporção do número de fêmeas e de machos no estado de pré-postura ou postura e pós-postura, através da classificação macroscópica dos estados de	

maturação das gónadas. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017. 63

Tabela 21 - Evolução mensal da proporção do número de fêmeas (n) com o IGS $\geq 14,97$ e do $E_2 \geq 51,52$ (ng/ml) em cada mês de estudo, no estado pré-postura. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017. 64

Tabela 22 - Evolução mensal da proporção do número de machos (n) com $11-KT \geq 5,21$ ng/ml e $\leq 0,78$ ng/ml em cada mês de estudo, no estado de postura e pós-postura. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017. 65

Lista de figuras

Figura 1 - Representação esquemática do oócito com referencia às camadas que compõem o invólucro folicular; C: Citoplasma; CG: Camada das células granulosas; CT: Cama das células teca; IF: Invólucro folicular; MB: Membrana basal; N: Núcleo; ZR: Zona radiata (adptado de: Harvey and Carolsfeld, 1993).	4
Figura 2 - Representação esquemática do testículo. CI: Compartimento intersdticial; CL: Compartimento lobular; EC: Espermatocisto; CLY: Células Lydig no compartimento intersticial; CS: Células Sertoli no compartimento lobular; MB: Membrana Basal; EZ: Espermatozoides no lúmen (adptado de: Billard, 1986).	7
Figura 3 - Representação esquemática do sistema dos teleósteos (adaptado em: Ferreira, 2001).	9
Figura 4 - Representação esquemática da síntese das principais hormonas esteroides sintetizadas geralmente pelos teleósteos. P450scc: “P450 side-chain cleavage”; P450c17: 17-hidroxilase ou C17-C20-liase; 3 β -hidroxisteroide dehidrogenase; 20 β -HSD: 20 β -hidroxisteroide dehidrogenase; P450arom: P450 arometase (adptado de: Oliveira, 2006; Lubzens et al., 2010; Kagawa, 2013).	12
Figura 5 - Representação esquemática das principais hormonas esteroides sintetizadas geralmente pelos teleósteos. A: Síntese das principais hormonas sintetizadas nas primeiras fases da espermatogénese (fase de proliferação mitótica e meiótica, e diferenciação do espermatozóide; B: Síntese das hormonas esteroides mais abundantes no sangue na fase maturação; P450scc: “P450 side-chain cleavage”; P450c17: 17-hidroxilase ou C17-C20-liase; 3 β -hidroxisteroide dehidrogenase; 20 β -HSD: 20 β -hidroxisteroide dehidrogenase (adptado de: Hall, 1984; Schoonen and Lambert, 1986; Babin et al., 2007; Schulz et al., 2010).	14
Figura 6 - Exemplar da Solha das Pedras (<i>Platichthys flesus</i> (Linnaeus, 1758)).	15
Figura 7 - Estuário do Rio Douro, Portugal.	19
Figura 8 - Fotografia ilustrativa da recolha de sangue a <i>P. flesus</i> junto à barbatana caudal.....	21
Figura 9 - Representação esquemática de um poço da microplaca do Kit ELISA para quantificação do esteróide (E ₂ para às fêmeas e 11-KT para os machos), pelo método ELISA. a) Incubação do marcador enzimático conjugado (ligado ao esteroide a quantificar), do antissoro e a solução padrão ou esteroide da amostra; b) Lavagem do poço para remover os excessos do poço; c) Adição do regente Ellman’s (substrato) (baseado no manual do Kit ELISA).	27

- Figura 10** - Evolução mensal do comprimento total (A), peso total (B) e dos vários índices somáticos (C, D e E) das fêmeas de solha do estuário do rio Douro. CT: comprimento total; PT: peso total; IGS: índice gonodossomático; IHS: índice hepatossomático; K: Fator de condição. 31
- Figura 11** - Classificação macroscópica dos vários estados de maturação do ovário de *P. flesus* do estuário do rio Douro; A: Estado de repouso; B: Estado de pré-vitelogénico; C: Estado vitelogénico; D: Estado pós-desova; CC: cavidade corporal; OV: Ovário. 35
- Figura 12** - Proporção dos estados de maturação dos ovários de *P. flesus* para cada mês de amostragem por avaliação macroscópica. REP: Estado de Repouso, PRE: Estado pré-vitelogénico; VIT: Estado vitelogénico; POS: Estado de pós-desova; nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017. 36
- Figura 13** - Alguns aspetos histológicos de várias células germinativas dos ovários de *P. flesus*, como o citoplasma (c), o núcleo (n) com os nucléolos (ncl), grânulos de vitelo (vt), alvéolos corticais (ac). A) Representação microscópica (100 µm) das ovogónias (OVG), oócito primário (OP), oócito perinucleolar (OPN) e oócito perinucleolar tardio (OPNT). B) Representação microscópica (100 µm) dos oócitos com os alvéolos corticais (OAC) e da oócito vitelogénico (OV). 38
- Figura 14** - Fotografia microscópica (100 µm) dos oócitos vitelogénicos tardios (OVT) de *P. flesus*. Do lado direito da imagem é apresentado um zoom (aumentado 20 µm) onde é possível observar alguns pormenores da célula numa escala microscópica mais pequena; ct: célula teca; cg: célula granulosa; zr: zona radiata; gv: grânulo de vitelo. 39
- Figura 15** - Avaliação microscópica dos estados de maturação do ovário de *P. flesus* do estuário do rio Douro (200 µm). A: REP (estado de repouso); B: PRE (estado pré-vitelogénico); C: VIT (estado vitelogénico); D: VITT (estado vitelogénico tardio); E: POS (estado pós-desova); OP: oócito primário; OPN: oócito perinucleolar; OPNT: oócito perinucleolar tardio; OV: oócito vitelogénico; OVT: oócito vitelogénico tardio; FPD: folículos da pós-desova. 40
- Figura 16** - Proporção dos estados de maturação dos ovários de *P. flesus* para cada mês de amostragem classificados por avaliação microscópica. REP: Estado de Repouso, PRE: Estado pré-vitelogénico; VIT: Estado vitelogénico; VITT: Estado vitelogénico tardio; POS: Estado de pós-desova; nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017. 41
- Figura 17** - Distribuição dos vários índices somáticos pelos estados microscópicos de maturação do ovário. IGS: índice gonodossomático (A); IHS: índice hepatossomático (B); K:

Fator de condição (D); REP: Estado de Repouso, PRE: Estado pré-vitelogénico; VIT: Estado vitelogénico; VITT: Estado vitelogénico tardio; POS: Estado de pós-desova.	42
Figura 18 - Evolução do valor médio da concentração de 17 β - estradiol (E ₂) com os respetivos desvios padrão ao longo dos meses de estudo. nov/16: novembro de 2016 (n=6); dez/16: dezembro de 2016 (n=9); jan/17: janeiro de 2017 (n=10); fev/17: fevereiro de 2017 (n=12); mar/17: março de 2017 (n=8); abr: abril de 2017 (n=5) mai/17: maio de 2017 (n=4).....	44
Figura 19 - Evolução do valor médio da concentração de 17 β - estradiol (E ₂) com os respetivos desvios padrão ao longo dos estados microscópicos de maturação.	45
Figura 20 - Relação entre as concentrações de 17 β -estradiol (E ₂) com o índice gonodossomático (IGS) ($y=3,95x-11,70$; $R^2= 0,60$, $p< 0,05$).	47
Figura 21 - Evolução mensal do comprimento total (A), peso total (B) e dos vários índices somáticos (C, D e E) dos machos de solha do estuário do rio Douro. CT: comprimento total; PT: peso total; IGS: índice gonodossomático; IHS: índice hepatossomático; K: Fator de condição.	48
Figura 22 - Classificação macroscópica dos vários estados de maturação dos testículos de <i>P. flesus</i> do estuário do rio Douro; A: Estado de prematuração; B: Estado em maturação; C e C1: Estado de maturação; D: Estado de pós-postura ou regressão; CE: Canal condutor de espermatozóide; T: Testículo.	51
Figura 23 - Proporção de estados de maturação dos testículos de <i>P. flesus</i> para cada mês de amostragem por avaliação macroscópica; PM: Estado de prematuração; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação; POS: Estado de pós-postura ou regressão; nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.	52
Figura 24 - Alguns aspetos histológicos das células Sertoli (CS) e de várias células germinativas dos testículos de <i>P. flesus</i> ; como o citoplasma (c), núcleo (n) com os nucléolos (ncl), espermatogónia (EPG) e o espermatócito (EPC).	53
Figura 25 - Avaliação microscópica dos estados de maturação dos testículos de <i>P. flesus</i> do estuário do rio Douro. A1: PM (estado de prematuração, 200 μ m); A2: PM (estado de prematuração, 50 μ m); A3: PM (estado de prematuração, 20 μ m); B1: EM (estado em maturação, 200 μ m); B2: EM (estado em maturação, 50 μ m); B3: EM (estado em maturação, 20 μ m); CS: Células Sertoli; EPC: Espermatócitos; EST: Espermatídeos; TC: Tecido intersticial.	54
Figura 26 - Continuação da avaliação microscópica dos estados de maturação dos testículos de <i>P. flesus</i> do estuário do rio Douro. C1: MT (estado de maturação, 200 μ m); C2: MT (estado de maturação, 50 μ m); C3: MT (estado de maturação, 20 μ m); D1: POS (estado pós-postura ou regressão, 200 μ m); B2: POS (estado pós-postura ou regressão, 50 μ m); B3: POS (estado	

pós-postura ou regressão, 50 μ m); CE: Canal eferentes; CS: Células Sertoli; EPC: Espermatócitos; EPG. Espermatogónias; EST: Espermatídeos; EPZ: Espermatozoides; TC: Tecido intersticial. 55

Figura 27 - Proporção dos estados de maturação dos testículos de *P. fesus* para cada mês de amostragem classificados por avaliação microscópica. PM: Estado de prematuraçã; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação; POS: Estado de pós-postura ou regressão; nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017..... 56

Figura 28 - Distribuição dos vários índices somáticos pelos estados microscópicos de maturação do testículo. IGS: Índice gonodossomático (A); IHS: Índice hepatossomático (B); K: Fator de condição (C); PM: Estado de prematuraçã; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação; POS: Estado de pós-postura ou regressão. 57

Figura 29 - Evolução do valor médio da concentração do 11-cetotestosterona (11-KT) com os respectivos desvios padrão ao longo dos meses de estudo. nov/16: novembro de 2016 (n=16); dez/16: dezembro de 2016 (n=9); jan/17: janeiro de 2017 (n=13); fev/17: fevereiro de 2017 (n=2); mar/17 março de 2017 (n=3); abr: abril de 2017 (n=0) mai/17: maio de 2017 (n=0). 59

Figura 30 - Evolução do valor médio da concentração de 11-cetotestosterona (11-KT) com os respectivos desvios padrão ao longo dos estados microscópicos de maturação. PM: Estado de prematuraçã; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação tardia; POS: Estado pós-postura ou regressão. 61

Lista de abreviaturas

11-KT – 11-Cetotestosterona

17, 20 β -P - 17 α ,20 α -dii-hidroxi-4-pregnen-3 β -ona

17-P - 17 α – hidroxiprogesterona

20 β -HSD ou DHP - 20 β -didoxiesteróide -desidrogenase

CGP – Células germinativas primordiais

CT – Comprimento total

DA – Dopamina

E₂ – 17 β -Estradiol

EPC - Espermatócitos;

EPC I – Espermatócito primário

EPC II – Espermatócito secundário

EPG - Espermatogónia;

EPG A – Espermatogónia A

EPG B – Espermatogónia B

EPZ - Espermatozoides

EST - Espermatídeos

FC - Fator de condição

FIM – Recetores promotores de maturação

FSH - Hormona estimuladora dos folículos

GnRH – Hormonas libertadora das gonadotropinas

GTH – Gonadotropina

IGS – Índice gonadossomático

IHS - Índice hepatossomático

LH – Hormona Luteinizante

MAT - Estado em maturação;

MATT - Estado de maturação tardia;

MIS - Esteroides Indutores de Maturação

OAC - Oócitos com os alvéolos corticais

OP - Oócito primário,

OPN - Oócito perinucleolar

OPNT - Oócito perinucleolar tardio

OV - Oócito vitelogénico

OVG - Ovogónias,

PM - Estado de prematuração;
POS - Estado de pós-postura ou regressão.
POS - estado pós-desova.
PRE - Estado pré-vitelogénico;
PT – Peso total
REP - Estado de repouso;
T- Testosterona
VIT - Estado vitelogénico;
VITT - Estado vitelogénico tardio;
VTG – Vitelogenina

***Capítulo I* - Introdução**

1.1. Introdução geral

Os ecossistemas aquáticos suportam mais de 30 mil espécies de teleósteos com uma ampla diversidade de estratégias reprodutivas (Ravi and Venkatesh, 2017). A título de exemplo, existem espécies que alteram o seu sexo ao longo do ciclo de vida, como é o caso da salema (*Sarpa salpa*) (Awise and Mank, 2009), ou permanecem com o mesmo sexo ao longo de todo o ciclo de vida, como é o caso do salmão do Pacífico (*Oncorhynchus sp.*) e da enguia (*Anguilla sp.*) (Murua and Saborido-Rey, 2003). A maioria dos teleósteos são ovíparos (o embrião desenvolve-se dentro de um ovo em ambiente externo) e apresentam diferenciação sexual (órgão feminino ou masculino) ao longo do seu ciclo de vida (Murua and Saborido-Rey, 2003).

Atualmente, existem espécies cujo ciclo reprodutivo está relativamente bem estudado, como é o caso dos principais salmonídeos comerciais, nomeadamente: o salmão do Pacífico (*Oncorhynchus spp.*) e salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Tyler and Sumpter, 1996). O mesmo não se verifica para as espécies não salmonídeas, pois ainda existem muitas dúvidas sobre o seu ciclo reprodutivo (Tyler and Sumpter, 1996; Mañanós et al., 2008).

O ciclo reprodutivo é um processo bastante complexo que consiste na produção de gâmetas maduros a partir de células germinativas primordiais imaturas, designadas de oócitos nas fêmeas e de espermatozoides nos machos (Mañanós et al., 2008). O processo de crescimento e diferenciação destas células haploides (células germinativas) nas gónadas é designado de gametogénese. A gametogénese, tipicamente designada de oogénese nas fêmeas e espermatogénese nos machos, é regulada por um complexo sistema hormonal, controlado por estímulos ambientais através do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas (Mañanós et al., 2008).

Estudar o ciclo reprodutivo dos teleósteos é fundamental para uma gestão adequada dos recursos pesqueiros, de modo a promover a sua sustentabilidade. O conhecimento do ciclo reprodutivo das espécies permite conhecer a sua dinâmica populacional e entender o funcionamento dos ecossistemas aquáticos, que é extremamente importante para uma garantia de stocks saudáveis pois, apesar de serem recursos renováveis, tornam-se limitados se forem alvo de uma má gestão (Moniz, 2000).

1.2. Maturação das gónadas

Ao longo da gametogénese nas fêmeas, os oócitos evoluem a partir de células germinativas em diferentes estados de desenvolvimento, nomeadamente: ovogónias (OVG), oócitos primários (OP), oócitos com alvéolos corticais (OAC) (ou pré-vitelogénicos), oócitos vitelogénicos (OV) e oócitos maduros (OM) (Brown-Peterson et al., 2011; Tyler and Sumpter, 1996). O mesmo acontece para os machos, mas neste caso as células germinativas são: espermatogónias (EPG) A e B, espermatócitos (ESC) primários (I) e secundários (II), espermatídeos (EPT) e espermatozoides (EPZ) (Armstrong et al., 2001; Schulz et al., 2010; Knapp and Carlisle, 2011). As células germinativas de ambos os géneros diferenciam-se a partir de uma população comum de células germinativas primordiais (CGP). Estas CGP são células diplóides que se desenvolveram no início da embriogénese e migraram para o epitélio germinativo, onde ocorre a formação das gónadas (Le Menn et al., 2007). Em determinada altura, estas células entram em proliferação mitótica originando as gónias, surgindo assim as principais fases da gametogénese do ciclo reprodutivo (Knapp and Carlisle, 2011; Urbatzka et al., 2011).

Conforme a predominância das fases de desenvolvimento das gâmetas nas gónadas, o desenvolvimento destas pode ser classificado em três grupos diferenciados de maturação, nomeadamente (Armstrong et al., 2001; Murua and Saborido-Rey, 2003; Mañanós et al., 2008; Urbatzka et al., 2011):

- Gónadas síncronas – as gâmetas desenvolvem-se todos ao mesmo tempo nas gónadas e, na época da desova, são libertados todos para o meio externo. Alguns exemplos são a lampreia do mar (*Petromyzon marinus*) e o salmão do pacífico (*Oncorhynchus sp.*);
- Gónadas síncronas por grupos – as gónadas possuem mais do que um estado de desenvolvimento de gâmetas ao longo do seu ciclo reprodutivo, mas existe predominância de um dos estados de desenvolvimento. Por exemplo o salmão do atlântico (*Salmo salar*), a truta do mar (*Salmo truttar*), e algumas espécies da ordem Pleuronectiformes (*Pleuronectes platessa*, *Hippoglossus hippoglossus*); e
- Gónadas assíncronas – não existe predominância de nenhum estado de desenvolvimento das gâmetas e têm capacidade de desovar mais do que duas vezes durante o ano ou fazer posturas sucessivas. Por exemplo o linguado comum (*Solea solea*) (Armstrong et al., 2001; Murua and Saborido-Rey, 2003) e a tilápia (*Oreochromis spp*) (Urbatzka et al., 2011).

1.2.1.Oogénese

Na maioria dos teleósteos, os ovários são estruturas pares inseridas na cavidade abdominal. O órgão apresenta geralmente uma forma cónica, com uma cavidade oca no centro (a cavidade ovárica), revestida por numerosas lamelas, distribuídas paralelamente ao longo das gónadas. Dentro das lamelas, as células germinativas (após a proliferação das CGP) encontram-se envolvidas por um invólucro folicular (Kagawa, 2013), principalmente composto por duas camadas de células somáticas reprodutivas: as células da teca e as células granulosas (figura 1). Estas células encontram-se separadas pela membrana basal (camada unicelular) e têm uma função endócrina no desenvolvimento das células germinativas (Figura 1) (Tyler and Sumpter, 1996). As células germinativas sofrem a oogénese, que pode ser descrita em quatro fases de crescimento (Kagawa, 2013):

- I) Fase de proliferação;
- II) Primeira fase de crescimento;
- III) Segunda fase de crescimento; e
- IV) Fase de maturação.

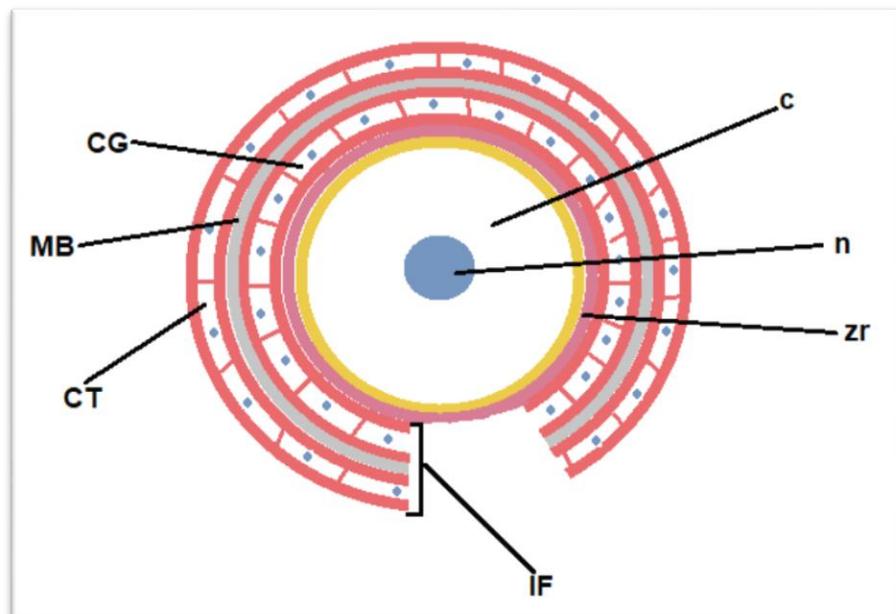


Figura 1 – Representação esquemática do oócito com referência às camadas que compõem o invólucro folicular; C: Citoplasma; CG: Camada das células granulosas; CT: Cama das células da teca; IF: Invólucro folicular; MB: Membrana basal; N: Núcleo; ZR: Zona radiata (adaptado de: Harvey and Carolsfeld, 1993).

A fase de proliferação dá-se com o aparecimento das OVG, através das CGP. As CGP encontram-se normalmente localizadas no epitélio do ovário, junto às oogónias e às células foliculares. As OVG são relativamente maiores do que as CGP e apresentam um único nucléolo esférico. Estas encontram-se normalmente agrupadas em forma de “cachos” e apresentam algumas células granulosas no seu contorno (Le Menn et al., 2007). Após numerosas divisões mitóticas, a OVG sofre a prófase I da meiose dando origem ao OP, sobre o invólucro folicular (membrana granulosa) (Armstrong et al., 2001; Le Menn et al., 2007; Urbatzka et al., 2011).

Com o aparecimento dos OP inicia-se a primeira fase de crescimento da oogénese. No início desta fase, o OP é estruturalmente parecido a uma OVG diplóide, mas distingue-se desta devido à estrutura nuclear relativamente mais fina (Le Menn et al., 2007). À medida que esta primeira fase se aproxima da segunda fase de crescimento, o OP tende a aumentar de tamanho e pode ser caracterizado em dois subestados de desenvolvimento: oócito perinucleolar (OPN) e oócito perinucleolar tardio (OPNT), relativos ao aumento do número de nucléolos no núcleo e ao aumento dos conteúdos no citoplasma (por exemplo: mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, ribonucleoproteicos) (Le Menn et al., 2007). Nesta fase ocorre também a multiplicação das células somáticas reprodutivas (Le Menn et al., 2007).

A segunda fase de crescimento do oócito é caracterizada pelo aparecimento dos OAC ou pré-vitelogénicos e o OV. O oócito OAC dá-se com o aparecimento dos primeiros alvéolos corticais e a suspensão da meiose. Os alvéolos corticais contêm glicoproteína ou mucopolissacarídeos (ácido PAS+) (Kagawa, 2013) e enzimas associadas (por exemplo: cisteína protéase) (Armstrong et al., 2001; Lubzens et al., 2010; Kagawa, 2013). As glicoproteínas são normalmente sintetizadas endogenamente e aumentam tanto em número como em tamanho, em direção ao núcleo. A determinada altura, juntamente com o aumento dos alvéolos corticais, as glicolipofosfoproteínas (grânulos de vitelo) são incorporadas por endocitose seletiva. A vitelogenina (VTG) é sintetizadas a nível hepático a partir do precursor de vitelo, a vitelina (VT). A VTG, depois de incorporada no citoplasma do oócito, é hidrolisada em duas proteínas: a lipovitelina e a fosfovítina (Ferreira, 2001). Além destes compostos orgânicos, incluindo a vitelogenina, também pode ocorrer a incorporação exógena de outros compostos orgânicos no citoplasma, tais como as gotículas lipídicas, hidratos de carbono, lípidos e vitaminas A e E (Kagawa, 2013). Estes compostos orgânicos formam o vitelo larvar, ou seja, constitui a reserva nutritiva das larvas para a fase endógena da alimentação (primeira fase de crescimento larvar) (Lubzens et al., 2010). Ao longo desta fase da oogénese, o OV aumenta em volume e diâmetro, devido ao elevado gradiente de incorporação de substâncias orgânicas

no citoplasma e à deposição dos alvéolos corticais na periferia do citoplasma, levando ao aumento da zona radiata (Le Menn et al., 2007). A zona radiata envolve o citoplasma (figura 1) e a sua função é prevenir a entrada de múltiplos espermatozoides na altura da fertilização (Urbatzka et al., 2011).

Na última fase da oogénese - fase de maturação - o núcleo do oócito inicia a migração para o pólo animal. Posteriormente, a membrana germinal do núcleo rompe-se e o oócito retoma a meiose (metáfase II), com o conteúdo nuclear disperso pelo citoplasma (Le Menn et al., 2007). Ainda nesta fase, verifica-se uma coalescência dos grânulos de vitelo, a hidratação do oócito (que sofre um ligeiro aumento de volume) e a condensação da cromatina no final da meiose (Tyler and Sumpter, 1996; Le Menn et al., 2007; Lubzens et al., 2010; Urbatzka et al., 2011). A hidratação do oócito geralmente só ocorre em espécies com ovos pelágicos (flutuam na coluna de água após a postura) (Tyler and Sumpter, 1996). No final da maturação do oócito, este separa-se do invólucro folicular e é lançado para o oviduto. Estes atingem o meio externo pelo poro genital, através da união dos ovidutos de ambos os ovários (Urbatzka et al., 2011).

1.2.2. Espermatogénese

Assim como os ovários, os testículos dos peixes são estruturas pares inseridas na cavidade corporal. A nível estrutural, estes são formados por dois compartimentos: o compartimento intersticial (ou interbular) e o compartimento lobular, ambos separados por uma membrana basal (figura 2) (Billard et al., 1982; Billard, 1986; Schulz et al., 2010). O compartimento intersticial é composto principalmente por células de Leydig, vasos sanguíneos, tecido nervoso e conjuntivo. O compartimento lobular é limitado pela membrana basal e, dentro deste compartimento, ocorrem dois tipos de células: as células de Sertoli e as células germinativas, integradas no epitélio. As células germinativas reprodutivas desenvolvem-se dentro do compartimento lobular, rodeadas pelas células de Sertoli, os espermatocistos, e dentro de cada espermatocisto existe um grupo de células germinativas num só estado de desenvolvimento de espermatogénese.

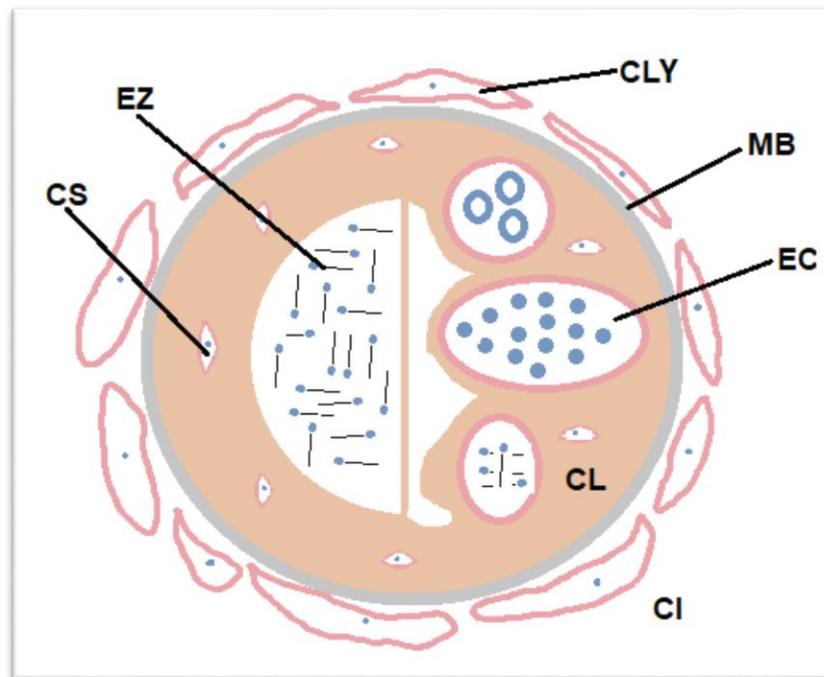


Figura 2 - Representação esquemática do testículo. CI: Compartimento intersticial; CL: Compartimento lobular; EC: Espermatocisto; CLY: Células de Leydig no compartimento intersticial; CS: Células de Sertoli no compartimento lobular; MB: Membrana basal; EZ: Espermatozoides no lúmen (adaptado de: Billard, 1986).

A espermatogénese inclui quatro fases de crescimento (Blazer, 2002; Mañanós et al., 2008; Schulz et al., 2010; Knapp and Carlisle, 2011):

- I) Fase de proliferação mitótica;
- II) Fase de divisão meiótica dos espermatócitos;
- III) Fase da espermiogénese; e
- IV) Fase da maturação.

Na primeira fase de crescimento - fase da proliferação mitótica - as CGP sofrem um processo de autorrenovação, dando origem às espermatogónias A através de várias divisões mitóticas, em que o número de divisões varia de espécie para espécie (Schulz et al., 2010). A seguir a EPG A dá origem à EPG B, por divisão mitótica (Schulz et al., 2010). Durante a proliferação mitótica, a EPG A sofre uma proliferação mitótica muito mais lenta do que a EPG B (Knapp and Carlisle, 2011). Este fenómeno leva ao aumento do volume do espermatocisto devido à duplicação das células germinativas por divisão mitótica (Mañanós et al., 2008). Esta fase termina com a última divisão mitótica, onde o EPG B dá origem ao EPC I (Knapp and Carlisle, 2011).

Após a formação do EPC I, inicia-se a segunda fase da espermatogénese, a fase da divisão mitótica dos espermatócitos. Esta fase consiste em duas divisões mitóticas, onde na primeira divisão o EPC I procede a meiose através da duplicação do DNA à recombinação genética, levando à formação dos EPC II. Esta célula germinativa, por sua vez, passa rapidamente para a segunda divisão meiótica, mas sem a duplicação do DNA, dando origem aos espermatídeos (arredondados) (Knapp and Carlisle, 2011).

Na fase da espermiogénese, os espermatídeos arredondados mudam a sua forma e estrutura para espermátídeos alongados e adquirem a especialização necessária para se tornarem espermatozoides maduros (Mañanós et al., 2008). Após o aparecimento do flagelo, o espermatozoide flagelado é lançado para o lúmen devido ao rompimento das células germinativas que formam o spermatocisto (fase da maturação).

Dentro do lúmen, os espermatozoides flagelados adquirem as características necessárias para se moverem assim que estiverem em contacto com a água após a postura, devido a processos fisiológicos específicos (fluidos de hidratação de esperma) (fase IV). Estes são depois armazenados ao longo dos canais eferentes e na época de postura são lançados através do poro genital dos peixes, tal como acontece nas fêmeas (Mañanós et al., 2008).

À medida que as células germinativas se desenvolvem ao longo da espermatogénese, as células diminuem em tamanho (diâmetro) de uma forma gradual. Nas células meióticas, a diminuição do tamanho da célula está relacionada com o grau de condensação dos cromossomas. A visível diminuição do tamanho das células ao longo das fases de espermatogénese é utilizada como critério de identificação dos vários estados de células germinativas dentro do testículo, através do microscópio ótico (Blazer, 2002; Kagawa, 2013).

1.3. Endocrinologia do ciclo reprodutivo

Tal como todos os vertebrados, o ciclo reprodutivo dos teleósteos é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gónadas (figura 3).

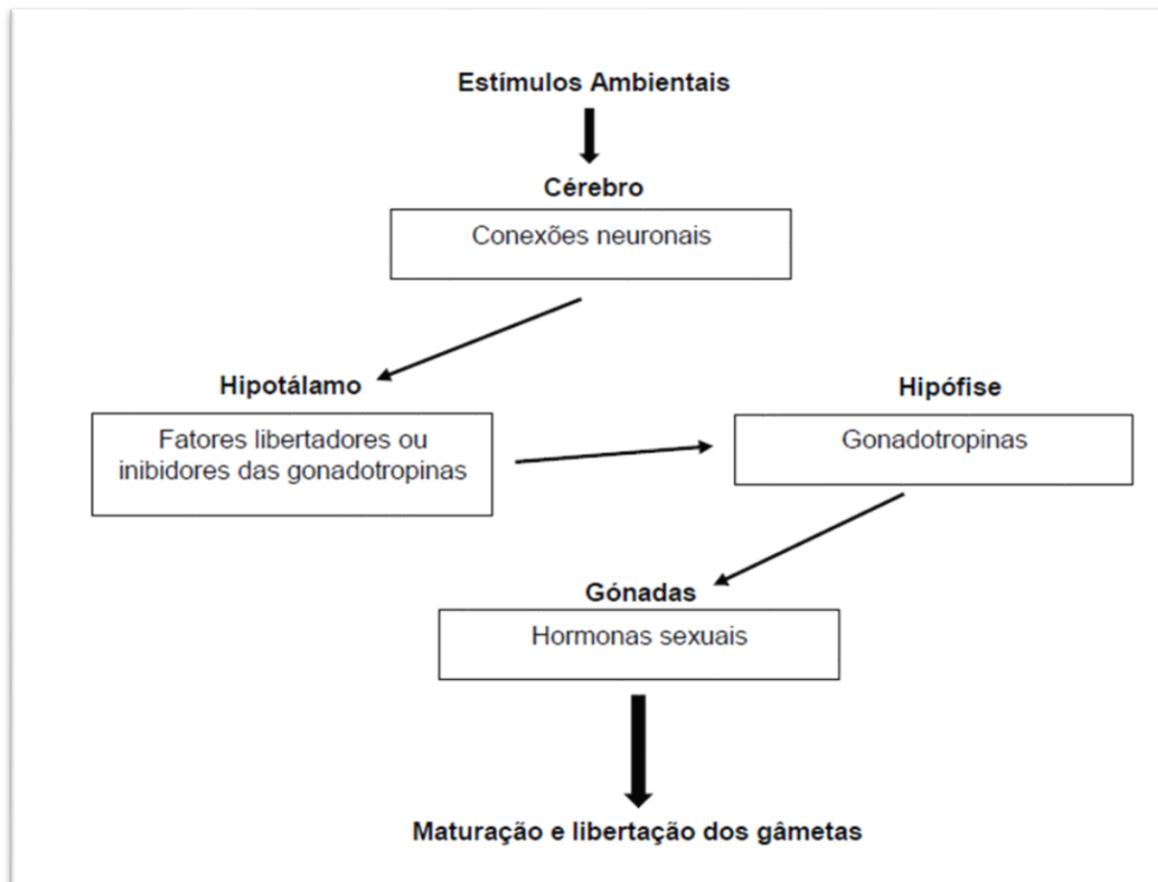


Figura 3 - Representação esquemática do sistema dos teleósteos (adaptado de: Ferreira, 2001).

Geralmente, nos peixes com o ciclo reprodutivo sazonal (posturas síncronas), o ciclo reprodutivo pode ser influenciado por estímulos ambientais, nomeadamente a temperatura da água e o fotoperíodo, como é o caso da solha de inverno (*Pleuronectes americanus*) (Harmin et al., 1995). Estes estímulos ambientais atingem os sensores específicos e estes transformam-nos em sinais eletroquímicos que se propagam pelos neurónios (o sistema neuroendócrino) até atingirem o hipotálamo (Damasceno-Oliveira et al., 2012). O hipotálamo procede com uma resposta fisiológica através da secreção ou inibição das hormonas libertadoras das gonadotropinas (GnRH). Estas GnRH são um decapeptido que regula a síntese de gonadotropinas (GTH) pela hipófise, através da ligação direta entre os dois eixos que acabam por se ligar a recetores membranares específicos (os GnRH-R) junto das células

gonadotrópicas. Esta ligação direta consiste na projeção das GnRH para as células de fibras neuronais da hipófise (Mañanós et al., 2008). Deste modo, as GTH são sintetizadas e libertadas para a corrente sanguínea, de modo a provocar uma reação fisiológica nas gónadas. É importante realçar que entre o hipotálamo e a hipófise pode ocorrer um efeito negativo provocado pelo sistema dopaminérgico, através da secreção da dopamina (DA). Os neurónios libertam a DA que por sua vez inibe a síntese e libertação de GnRH na hipófise, interferindo com o sinal de tradução da GnRH ao bloquear o seu recetor, o GnRH-R.

As GTH são formadas por dois tipos de hormonas: a hormona estimuladora dos folículos (FSH, anteriormente conhecida como GTH I) e a hormona leuteinizante (LH, anteriormente conhecida como GTH II) (Babin et al., 2007; Mañanós et al., 2008; Lubzens et al., 2010; Schulz et al., 2010; Knapp and Carlisle, 2011; Urbatzka et al., 2011). Ambas as hormonas pertencem à família das hormonas glicoproteicas, com uma subunidade α e β . A subunidade α é comum entre as duas hormonas e a subunidade β é específica de cada hormona, pois determina a atividade biológica da hormona (Ferreira, 2001). Ambas as GTHs apresentam uma função característica na gametogénese. Generalizadamente, os níveis de FSH aumentam e os níveis de LH permanecem muito baixos no plasma sanguíneo durante a fase inicial da gametogénese. Numa fase mais avançada, como a maturação das gâmetas, os níveis de FSH diminuem e os de LH aumentam no plasma sanguíneo, apresentando valores mais elevados na maturação e na ovulação. Este tipo de padrão hormonal das GTH é muito característico em espécies salmonídeas (espécies com uma única postura – síncronos) (Tyler and Sumpter, 1996; Schulz et al., 2010; Knapp and Carlisle, 2011; Urbatzka et al., 2011; Kagawa, 2013). Em espécies não salmonídeos (com múltiplas posturas – assíncronos) o padrão das GTH não é tão evidente pois, normalmente, os níveis de FSH e de LH são relativamente predominantes em todo o ciclo reprodutivo, havendo uma ligeira diferenciação das concentrações durante a gametogénese (FSH > LH no início da gametogénese e LH > FSH no fim da gametogénese) (Mañanós et al., 2008).

Relativamente à concentração de GTH no plasma sanguíneo, estas vão regular a síntese de hormonas esteroides sexuais nas gónadas pelas células somáticas (célula da teca e célula granulosa para as fêmeas e células de Leydig para os machos) (esteroidogénese). Além disso, as hormonas esteroides têm como função regular a secreção e libertação das GTH, pois vão estimular o GnRH-R na hipófise e também inibem a secreção das GTH através do sistema dopaminérgico. Logo, o cérebro é constantemente informado acerca da evolução do desenvolvimento das gónadas pelos níveis de esteroides durante o ciclo reprodutivo (Mañanós et al., 2008).

1.3.1. Regulação endócrina da oogénese

Nos teleósteos, a esteroidogénese (biossíntese de hormonas esteroides sexuais) ocorre nas células da teca e granulosa (Kagawa, 2013). Este processo é bem conhecido nos salmonídeos e, normalmente, existe um padrão comum hormonal bem diferenciado nas principais fases da oogénese: a fase da vitelogénese e de maturação (Ferreira, 2001). Contudo, nas espécies não salmonídeas, o ciclo hormonal nem sempre é diferenciado entre as principais fases da oogénese (Rosenfeld et al., 2007; Mañanós et al., 2008).

A vitelogénese ocorre através da ligação FSH aos recetores membranares das células da teca. Isto faz com que o sistema adenilcalse/AMPC seja ativado, levando à formação da testosterona (T) através de várias reações enzimáticas a partir do colesterol (ver figura 4). Por sua vez, a T é convertida em 17β -estradiol (E_2) nas células da granulosa pela enzima aromatase (figura 4). O E_2 , ao entrar na corrente sanguínea, estimula a transcrição do gene a VTG no fígado e a VTG é libertada para o plasma de modo a ser incorporada no oócito (Babin et al., 2007; Urbatzka et al., 2011). Ao longo desta fase (vitelogénese), os níveis de E_2 aumentam e atingem os seus valores máximos no final da vitelogénese (Tyler and Sumpter, 1996), quando os níveis de FSH diminuem e os níveis de LH aumentam no plasma, levando a uma diminuição brusca do E_2 (Babin et al., 2007; Kagawa, 2013).

Com o aumento dos níveis de LH no plasma, a 17α -hidroxiprogesterona (17-P) é convertida em $17\alpha,20\alpha$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\beta\text{-P}$) (um dos esteroides indutores da maturação (MIS)), pela ação da enzima 20β -dihidroxiesteróide-desidrogenase ($20\beta\text{-HSD}$) nas células da granulosa (ver figura 4) (Young et al., 1982). Em algumas espécies não salmonídeas verifica-se a conversão da 17-P em $17\alpha,20\beta,21$ -trihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\beta,21\text{-P}$ ou DHP), em vez da $17,20\beta\text{-P}$, sendo este o progestagénio mais abundante durante a maturação do oócito (ex.: pregado (*Scophthalmus maximus L.*) (Mugnier et al., 1997) e bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*) (Tveiten et al., 2010)). À medida que os níveis dos MIS aumentam ao longo da maturação, os fatores promotores de maturação (FIM) são ativados nos recetores membranares do oócito (Oliveira, 2006). Os FIM provocam uma série de reações no oócito, nomeadamente o rompimento do núcleo, a sua hidratação, a coalescência das vesículas e, por fim, a ovulação.

No entanto, um estudo defende que em algumas espécies (*Hucho perryi* e *Cyprinus carpio*), a fase de proliferação é regulada por baixas concentrações de E_2 e $17,20\beta\text{-P}$ ou DHP (Lubzens et al., 2010).

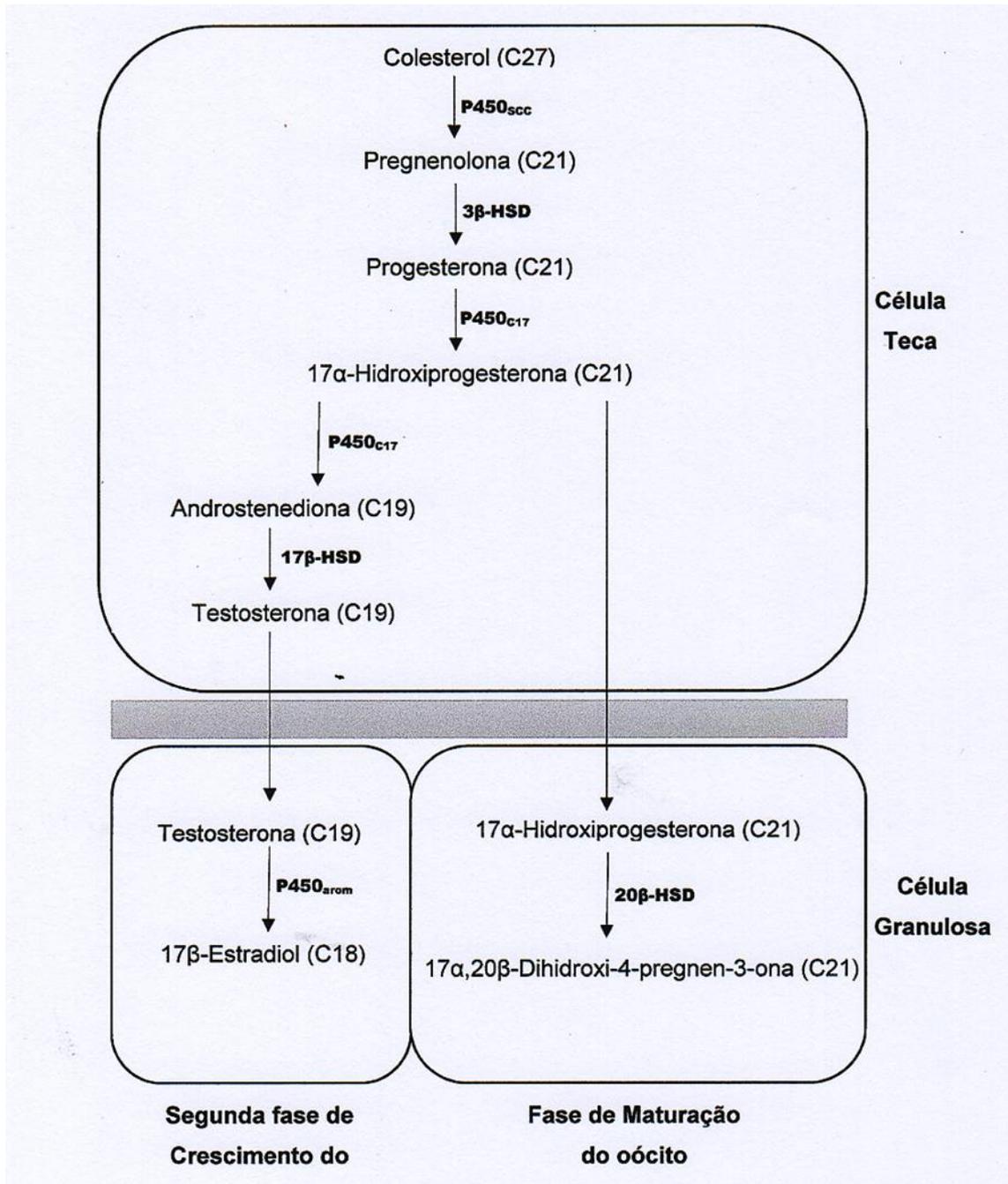


Figura 4 – Representação esquemática das principais hormonas esteroides sintetizadas pelos teleósteos. P450_{scc}: "P450 side-chain cleavage"; P450_{c17}: 17-hidroxilase ou C17-C20-liase; 3β-HSD: 3β-hidroxisteroide dehidrogenase; 20β-HSD: 20β-hidroxisteroide dehidrogenase; P450_{arom}: P450 arometase (adaptado de: Oliveira, 2006; Lubzens et al., 2010; Kagawa, 2013).

1.3.2. Regulação endócrina da espermatogénese

Geralmente, as diferentes fases de espermatogénese são controladas por variações dos níveis de esteroides (Schulz et al., 2010). Normalmente, a biossíntese de hormonas esteroides (nas células de Leydig) é controlada pelos níveis de FSH e LH (Billard et al., 1982; Billard, 1986; Knapp and Carlisle, 2011). Posteriormente, as células de Sertoli regulam o desenvolvimento das células germinativas pelas hormonas esteroidessexuais sintetizadas pelas células de Leydig. Estas células apresentam recetores específicos para a FSH e LH, ao contrário das células de Sertoli, que têm unicamente recetores membranares para a FSH. Apesar destas apresentarem recetores para a FSH, a gonadotropina só estimula a proliferação das células de Sertoli e não influencia de forma direta o desenvolvimento das células germinativas (Schulz et al., 2010).

Com o desenrolar da espermatogénese, as hormonas esteroides sexuais mais produzidas por influência da FSH são o androgénio 11-cetotestosterona (11-KT) e, por ação da LH, o progestogénio (17,20 β -P ou DHP). Durante as primeiras fases da espermatogénese (fase I e II), os níveis de 11-KT aumentam no plasma sanguíneo, acabando por diminuir com a iniciação da divisão meiótica das células germinativas (fase III). Por sua vez, os níveis de 17,20 β -P ou DHP aumentam no plasma e atingem os valores máximos na maturação do espermatozoide (fase IV). Os progestogénios induzem o rompimento dos espermatocistos e estimulam a mobilidade do espermatozoide nos canais eferentes (Schulz et al., 2010; Knapp and Carlisle, 2011).

Assim como acontece com o E₂, a 11-KT é sintetizada a partir da testosterona (ver figura 5) mas, para algumas espécies, como é o caso do peixe gato (*Clarias gariepinus*), a 11-KT é sintetizada a partir 11 β -Hidroxitesterona, pela enzima 20 β -HSD (ver em Schoonen and Lambert, 1986). Além disso, estudos recentes colocam a hipótese do E₂ influenciar o início da espermatogénese (fase I) em algumas espécies de teleósteos (exemplo da truta), por ação da FSH (Schulz et al., 2010; Knapp and Carlisle, 2011).

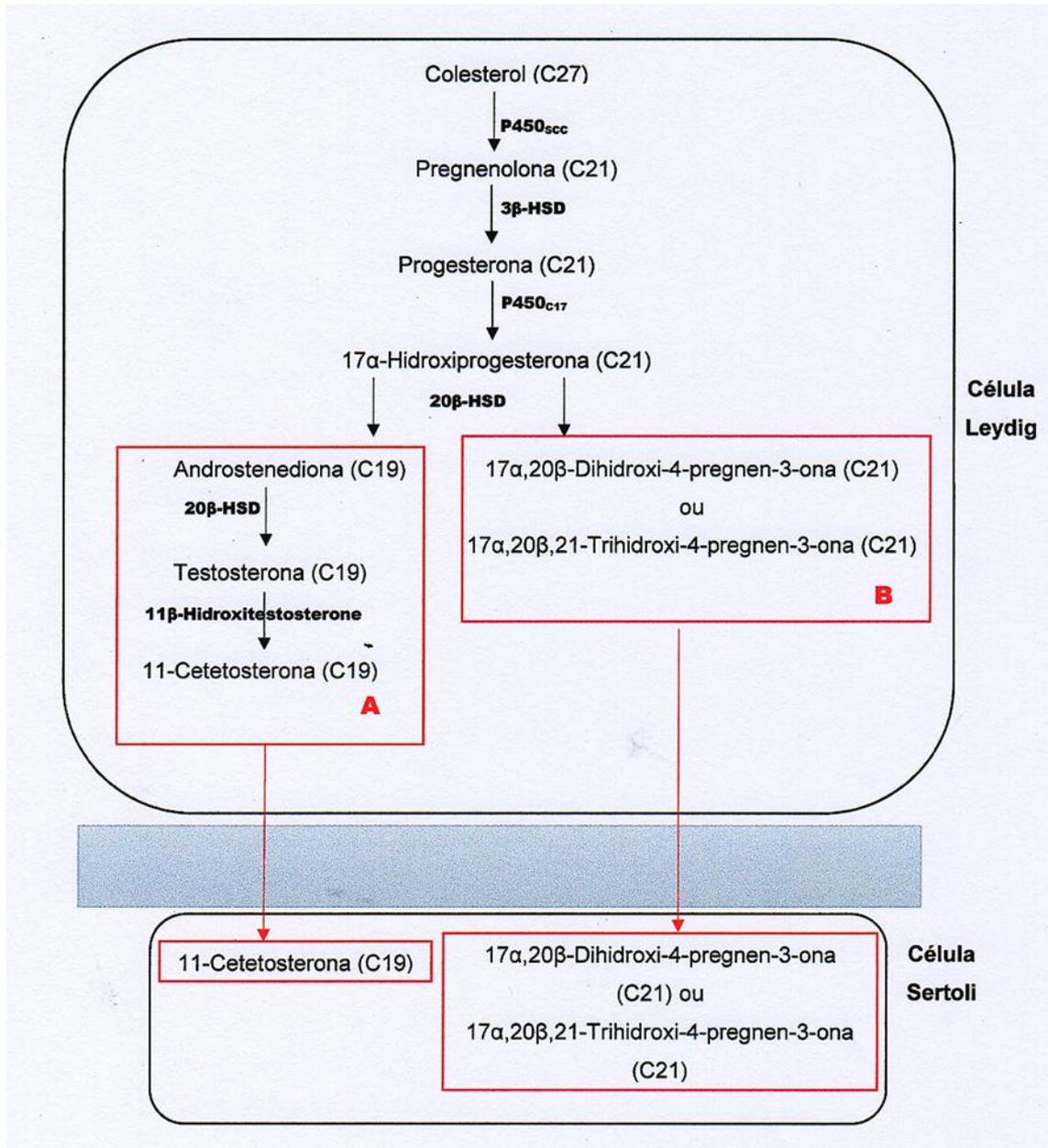


Figura 5 - Representação esquemática das principais hormonas esteroides sintetizadas geralmente pelos teleosteos. A: Síntese das principais hormonas sintetizadas nas primeiras fases da espermatogénese (fase de proliferação mitótica e meiótica, e diferenciação do espermatozoide); B: Síntese das hormonas esteroides mais abundantes no sangue na fase maturação; P450_{scc}: "P450 side-chain cleavage"; P450_{C17}: 17-hidroxilase ou C17-C20-liase; 3β-hidroxisteroide dehidrogenase; 20β-HSD: 20β-hidroxisteroide dehidrogenase (adaptado de: Hall, 1984; Schoonen and Lambert, 1986; Babin et al., 2007; Schulz et al., 2010)

1.4. Ciclo de vida da solha das pedras

A solha das pedras *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758) é uma espécie pertencente à ordem dos Pleuronectiformes, família PLEURONECTIDAE (figura 6).



Figura 6 – Exemplar de solha das pedras (*Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758)).

P. flesus é uma espécie demersal migratória (Oliveira, 2006), com uma ampla distribuição geográfica ao longo do Oceano Atlântico, apresentando uma maior abundância no Norte da Europa (FAO, 2017). Alimenta-se principalmente de pequenos peixes e invertebrados, com preferência para os crustáceos, anfípodes, poliquetas e bivalves (Vinagre et al., 2005; Mendes et al., 2014). O comprimento da primeira maturação varia entre 22 cm (Froese and Frieß, 1992) e 30 cm (Deniel, 1984) para as fêmeas e, entre os 18,5 cm (Kosior et al., 1996) e 25 cm (Muus and Nielsen, 1999) para os machos, sendo que estes atingem a primeira maturidade sexual mais cedo do que as fêmeas (machos: \approx 2 anos (Muus and Nielsen, 1999); fêmeas \approx 3 anos de idade (Deniel, 1984). Normalmente, a época de postura ocorre no final do inverno com uma postura anual (sincronia por grupos) (Janssen et al., 1995).

Devido à sua ampla distribuição geográfica, *P. flesus* apresenta várias estratégias no seu ciclo de vida (Daverat et al., 2012). Por exemplo no Mar Báltico, esta espécie apresenta duas estratégias de postura: a Norte, as solhas desovam nas zonas costeiras ou em águas pouco profundas deste habitat, enquanto no Sul, os indivíduos desovam nas águas mais profundas

(Daverat et al., 2012). Apesar destas particularidades regionais, o padrão comum do ciclo de vida descrito para a solha das pedras inclui uma migração reprodutiva. Tipicamente durante o inverno, os peixes maduros iniciam as suas migrações para o oceano para desovar (Cabral et al., 2007; Freitas et al., 2012). Após a eclosão dos ovos, os estados larvares e/ou juvenis migram para as zonas costeiras, nomeadamente para as áreas de viveiro como os estuários, onde após o assentamento iniciam uma vida associada ao fundo (Ramos et al., 2010; Ramos et al., 2017). Os juvenis permanecem nestes locais de viveiro, até atingirem a maturidade sexual e juntando-se mais tarde às populações adultas que vivem fora do estuário¹ (recrutamento) (Vasconcelos et al., 2008).

A nível pesqueiro, *P. flesus* é uma espécie com importância comercial (Cabral et al., 2007) e é capturada pelas embarcações costeiras nos estuários ou/e nas zonas costeiras. A partir do século XXI, entre 2004 e 2014 a captura de solha atingiu valores recorde com máximos de capturas a rondar as 24 467 toneladas em 2005, em comparação com o século XX, onde o limite máximo de capturas variou entre as 7 537 (1970) e 16 063 (1988) toneladas, a nível mundial (FAO, 2017). Em Portugal, entre 2004 a 2014, os limites de captura variam entre 9273 kg (2007) e os 1078 Kg (2012), apresentando os valores recordes em 2007 (comunicação pessoal, Docapescas-Porto e Lotas, SA, 2017).

Existem vários estudos sobre a importância dos estuários para as larvas e os juvenis de *P. flesus* ao longo da costa Portuguesa (Vasconcelos et al., 2007; Vasconcelos et al., 2008; Ramos et al., 2010; Vasconcelos et al., 2011; Freitas et al., 2012), que identificam estas zonas como áreas de viveiro, onde os estados iniciais de desenvolvimento de *P. flesus* podem passar um determinado período do seu ciclo de vida. Nesse período, os juvenis estão espacialmente separados dos adultos evitando sobreposição de nicho e de recursos, e a elevada quantidade de alimento e de locais de refúgio permitem um crescimento rápido e uma maior probabilidade de sobrevivência dos juvenis ((Vasconcelos et al., 2008; Vasconcelos et al., 2009; Ramos et al., 2010; Vasconcelos et al., 2011; Freitas et al., 2012).

Apesar da utilização dos estuários ser relativamente bem conhecida, constata-se uma falha de conhecimento sobre o ciclo reprodutivo de *P. flesus*, nomeadamente a época e local de postura. Morais et al. (2011) e Daverat et al. (2012) colocam em causa o padrão comum do ciclo de vida desta espécie, sugerindo que esta poderá, em alternativa, desovar dentro dos estuários e não efetuar migrações reprodutivas para alto mar, como descrito anteriormente.

¹ Os estuários são ambientes dinâmicos, onde ocorrem abruptas mudanças na salinidade, temperatura, oxigénio e turbidez, devido à influência das marés e a mistura de água doce com a água salgada.

Para melhor compreender o ciclo reprodutivo dos peixes, vários autores utilizaram marcadores naturais, como estudos microscópicos e macroscópicos do estado de desenvolvimento das gónadas (Palmer et al., 1995; Rinchard and Kestemont, 1996; Moulton and Burton, 1999; Nunes et al., 2011), variação dos índices somáticos (IGS, IHS e FC; (Htun-Han, 1978a; Guerriero, 2007) e variação temporal dos esteroides sexuais mais abundantes durante a gametogénese (Harmin et al., 1995; Moulton and Burton, 1999; Armstrong et al., 2001), E₂ para fêmeas (Methven et al., 1992) e 11-KT para os machos (Schoonen and Lambert, 1986; Armstrong et al., 2001).

Apesar da solha das pedras não ser uma das espécies mais procuradas pelo homem em comparação com outras espécies de teleósteos, como o bacalhau do Atlântico (*Gadus Morhua*) (que só em 2014 alcançou 1 373 460 toneladas de captura, aproximadamente sessenta vezes mais do que o stock de captura da solha no mesmo ano) (FAO, 2016), os estudos sobre o seu ciclo de vida não devem ser desvalorizados, atendendo ao aumento das capturas da solha das pedras nos últimos anos (FAO, 2016). Estudos para determinar o ciclo de vida, nomeadamente o ciclo reprodutivo, de uma espécie consumida pelo homem, são importantes para conseguir alcançar uma boa gestão dos stocks pesqueiros dessa mesma espécie. Com este conhecimento, será possível prevenir que espécies não ameaçadas, como é o caso de *P. flesus* (LC – pouco preocupante) (Munroe, 2010), cheguem a estados de conservação preocupantes determinados pela União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN).

1.5. Objetivos

Até ao presente existem relativamente poucos estudos sobre o ciclo reprodutivo da solha das pedras ao longo das costas centro e norte de Portugal continental, existindo ainda poucas evidências científicas sobre o local (Morais et al., 2011; Davarat et al., 2012) e época de reprodução da espécie. Assim, este trabalho tem como principal objetivo estudar o ciclo reprodutivo de *P. flesus* no estuário do rio Douro, ao longo de uma época de reprodução, mais concretamente:

- a) classificar macro e microscopicamente os estados de maturação de *P. flesus*;
- b) analisar a variação temporal de hormonas sexuais como E₂ e 11-KT no plasma das fêmeas e dos machos, respetivamente;
- c) determinar a época de postura da população de *P. flesus* do estuário do rio Douro.

Capítulo II - Material e Métodos

2.1. Trabalho de campo

2.1.1. Área de estudo

O estuário do rio Douro (figura 7) é a maior bacia hidrográfica da Península Ibérica, estendendo-se por 21,60 km, sendo limitado a montante pela barragem de Crestuma – Lever (41°04'20"N e 08°25'45"W) (Ramos, 2001). A largura mínima do estuário é de 135 metros entre a ponte D. Luís e a ponte D. Maria (41°08'30"N e 08°35'50"W) e a largura média é de 375 metros (Ramos, 2001). A sua profundidade média é de 7 a 10 metros (Peixoto, 2016) e o canal de navegação possui normalmente 6 metros de profundidade e 60 metros de largura, provocado pela dragagem (escavação dos estuários) (Ramos, 2001). A amplitude das marés normalmente não ultrapassa os 3,80 metros (Vasconcelos et al., 2007) e a média total do caudal varia entre os 450 e os 480 m³s⁻¹, apresentando no inverno uma média entre os 917 a 2160 m³s⁻¹ e no verão entre os 25 a 178 m³s⁻¹ (Vinagre et al., 2005). O estuário do rio Douro é caracterizado pela presença, mais ou menos constante, de uma cunha salina evidente na coluna de água (água doce na superfície e água salgada no fundo) (Ramos, 2001).



Figura 7 – Fotografia do estuário do Rio Douro, Portugal, tirada durante uma campanha de amostragem do presente trabalho.

2.1.2. Estratégia de amostragem

De modo a atingir os objetivos propostos neste estudo, foram efetuadas campanhas de amostragem mensais diurnas no estuário do rio Douro, entre novembro de 2016 e maio de 2017, de modo a cobrir toda a época de reprodução de *P. flesus* (Monteiro, 2010). A estratégia de amostragem consistiu em recolhas mensais de 30 indivíduos adultos, com um comprimento total superior a 23 cm (considerado com o tamanho mínimo de reprodução segundo Sobral, 2007). Adicionalmente, entre janeiro e março de 2017, foram efetuadas amostragens semanais extras de 10 indivíduos adultos, de forma a aumentar o efetivo de peixes amostrados na fase final da maturação, ou seja, em postura. A captura de exemplares de solha das pedras foi realizada em maré vazante com uma rede de arrasto de portas (7 m de comprimento e 3,5 m de altura), a bordo de uma embarcação de pesca profissional (“Atrevido”, matrícula P-1417-L, propriedade do Sr. Manuel Joaquim Gomes Tavares). Os indivíduos, depois de capturados, foram devidamente acondicionados em malas térmicas contendo água do estuário e arejadores (para manter boas condições de oxigenação) e transportados vivos para o laboratório nas instalações do CIIMAR, no Novo Terminal de Cruzeiros do Porto de Leixões.

2.2. Trabalho laboratorial

2.2.1. Amostragem biológica

Uma vez no laboratório, os peixes foram anestesiados com uma dose letal de anestésico MS-222 (Tricaína metano sulfato a 0,25%), diluída em água do estuário, seguindo os princípios éticos de bem-estar animal de acordo com a Diretiva da União Europeia 2010/63/EU “à proteção de animais utilizados para fins científicos”. Seguidamente, procedeu-se à amostragem biológica que começou pela recolha dos dados biométricos, tais como: peso total (utilizando uma balança Kern EW 6200-2NM) e comprimento total. De seguida, determinou-se o sexo de cada indivíduo através da visualização macroscópica das gónadas, após abertura da sua cavidade abdominal. Foram também recolhidas amostras de diferentes tipos de material biológico para posterior análise laboratorial, nomeadamente:

- Sangue - recolhido a partir da veia caudal no lado cego (posterior) do peixe, junto à barbatana caudal (ver figura 8). As seringas e agulhas utilizadas foram previamente heparinizadas (heparina 1:10 em soro fisiológico) de modo a evitar a coagulação do sangue. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 1.5 g

durante 10 minutos a 4 °C (Monteiro, 2010), numa centrífuga refrigerada (VWR Microstar 17R). Após centrifugação, recolheu-se o sobrenadante (plasma) (Monteiro, 2010) e conservou-se em *ependorfs* devidamente identificados numa arca a -80°C, para posterior quantificação de hormonas esteroides sexuais, nomeadamente E₂ para as fêmeas e 11-KT para os machos.



Figura 8 – Fotografia ilustrativa da recolha de sangue de *P. flesus* junto à barbatana caudal, durante uma das amostragens do presente trabalho.

- Gónadas – antes da extração, as gónadas foram classificadas macroscopicamente, segundo os critérios da tabela 1 e 2 (adptado de Sobral, 2007). Após extração e pesagem de ambas as gónadas em balança analítica de precisão (modelo Radwag WTB 200 d=0,001 g), estas foram imediatamente fixadas em formaldeído (4%) durante 24-48 horas e, posteriormente, armazenadas em etanol (70%) para as análises histológicas (Madureira et al., 2012).
- Fígado – após extração, o fígado foi pesado em balança analítica de precisão (0,001g).

Tabela 1 - Avaliação macroscópica do estado de maturação dos ovários (adaptado de: Sobral, 2007)

Fêmeas	Estado	Observações
REP	Repouso	Os ovários são pequenos e apresentam uma coloração rosada, ligeiramente translúcida.
PRE	Pré-vitelogénese	Os ovários são maiores, ocupam mais de 1/3 da cavidade abdominal, e a sua coloração é rosa claro e sem translucidez.
VIT	Vitelogénese	Os ovários ocupam toda a cavidade abdominal e são extremamente volumosos.
MAT	Maturação	Os ovários ocupam toda a cavidade abdominal e os oócitos são expulsos pelos canais condutores dos óvulos por uma leve pressão abdominal.
POS	Pós-desova	Os ovários são compridos e pouco volumosos; a sua estrutura é extremamente flácida ou mole.

Tabela 2 - Avaliação macroscópica do estado de maturação dos testículos (adaptado de: Sobral, 2007)

Machos	Estado	Observações
PM	Prematuração	Os testículos apresentam uma estrutura relativamente oval. A sua coloração é esbranquiçada e são muito pequenos. Os canais condutores de esperma são relativamente transparentes e de difícil deteção.
EM	Em maturação	Os testículos apresentam uma estrutura cilíndrica em forma de “feijão”. As gónadas são grandes, consistentes e volumosas. A sua coloração é branca ou relativamente esbranquiçada.
MT	Maturação	Os testículos são por norma brancos, volumosos, pouco resistentes e apresentam espermatozoides nos canais eferentes.
POS	Pós-postura ou regressão	Os testículos são pequenos e esbranquiçados. Mas, ao contrário do estado PM, os canais condutores de esperma são esbranquiçados e de fácil visualização, pois contêm vestígios de espermatozoides.

2.2.2. Classificação microscópica do estado de maturação das gónadas

A classificação microscópica das gónadas foi efetuada através de técnicas de histologia segundo metodologias descritas em Madureira et al. (2012). Para cada indivíduo utilizou-se a gónada do lado cego (posterior) para análise, exceto quando esta não se encontrava em boas condições de fixação. A gónada foi dividida em 3 partes (anterior, média, posterior), para perceber se a maturação da gónada era constante ao longo de toda a gónada (Palmer et al., 1995). As 3 partes da gónada foram processadas durante 12 horas num processador de tecidos automático (Leica TP1020), consistindo em 2 banhos de 1h em etanol a 70%, 96%, 99%, etanol e xilol (50:50, v/v), xilol e parafina (Madureira et al., 2012). A inclusão, em parafina a 65°C foi efetuada com moldes de inclusão numa estação Leica EG 1140C. Cada bloco foi depois cortado no micrótopo Leica RM2155 com uma espessura de 4 µm. O tecido foi corado por hematoxilina e eosina (Barr, 1963). O tecido foi estudado através do microscópico ótico (Olympus BX50) com uma câmara digital incorporada (Olympus DP21), para a obtenção de fotografias de cada estado de maturação.

2.2.2.1 Fêmeas

Atendendo ao elevado número de fêmeas capturadas (n=217), efetuou-se uma subamostragem de 57 fêmeas para análise microscópica (histológica) da gónada. Esta subamostragem baseou-se na variação de todos os estados de maturação do ovário a nível macroscópico em cada campanha de amostragem.

A avaliação microscópica do estado de maturação dos ovários foi efetuada com base nos critérios descritos por Janssen et al. (1995) (tabela 3), considerando sempre o estado mais avançado das células germinativas presentes no ovário.

Tabela 3- Avaliação microscópica do estado de maturação dos ovários (adaptado de: Janssen et al. 1995).

Fêmeas	Estado	Observações
REP	Repouso	Ovário caracterizado por numerosos oócitos em fase perinucleolar tardio. Estes oócitos marcam o início de um novo ciclo anual.
PRE	Pré-vitelogénese	Presença de oócitos com os alvéolos corticais.
VIT	Vitelogénese	Oócitos apresentam grânulos de vitelo e todas as fases anteriores das células germinativas, assim como os oócitos com alvéolos corticais.
VITT	Vitelogénese tardia	Ovário contém oócitos ligeiramente maiores ao estado anterior e o seu citoplasma está completamente preenchido com grânulos de vitelo. Os oócitos com alvéolos corticais não estão presentes nesta fase.
MAT	Maturação	Ocorre a migração do núcleo do oócito para o polo animal celular.
POS	Pós-desova	As lamelas ovígeras estão vazias. Presença de ovogónias, oócitos primários e oócitos com nucléolos perinucleolar.

2.2.2.2. Machos

Todos os machos obtidos nas amostragens mensais e semanais foram analisados histologicamente, num total de 50 machos, isto porque o número total em cada amostragem foi bastante inferior ao número total de fêmeas capturadas.

A avaliação microscópica do estado de maturação do testículo foi realizada com base nos critérios de Weltzien et al. (2002), considerando sempre o estado mais avançado das células germinativas presentes no testículo.

Tabela 4 - Avaliação microscópica do estado de maturação dos testículos (adaptado de: Weltzien et al., 2002).

Machos	Estado	Observações
PM	Prematuração	No testículo observa-se os espermatócitos. A presença de espermatócitos indica que a meiose se iniciou.
EM	Em maturação	No testículo verifica-se a existência de espermatídios.
MT	Maturação	O testículo apresenta espermatozoides. Os espermatozoides também são observados no lúmen
POS	Pós-postura ou regressão	Testículo em regressão. Todos os estados de desenvolvimento das células germinativas podem estar presentes.

2.2.3. Quantificação dos esteroides sexuais

Para a quantificação dos esteroides sexuais no plasma sanguíneos dos peixes foi utilizado o método Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Este método é um teste imunoenzimático baseado em reações antígeno-anticorpo detetáveis por uma reação enzimática. Para quantificar o E₂ e o 11-KT no plasma sanguíneo das fêmeas e dos machos, recorreu-se aos kits ELISA da Cayman Chemical: Estradiol ELISA Kit – item No. 582251 (com ~15 pg/ml de sensibilidade) e 11-keto Testosterone ELISA Kit item No. 582751 (com ~1,3 pg/ml de sensibilidade), respetivamente. Os procedimentos analíticos foram efetuados de acordo com os protocolos do kit.

2.2.3.1. Metodologia da quantificação

O E₂ foi doseado diretamente do plasma e a 11-KT requereu uma extração prévia (4x2ml de acetato de etilo/hexano (50:50)) de 500 µl de plasma. Depois da extração o acetato de etilo/hexano foi evaporado sob uma leve corrente de azoto à temperatura ambiente. O extrato foi suspenso em 500 µl de solução tampão ELISA. Neste método, o antigénio específico para o esteróide a dosear adere ao fundo do poço da microplaca através das proteínas de bloqueio, onde foram realizados os ensaios em duplicado. Dentro dos poços foram colocadas as amostras diluídas (plasma concentrada ou 100x diluída para o E₂ e o extrato plasmático diluído 100x para o 11-KT) e as soluções padrões (66 pg/ml a 4000 pg/ml para às fêmeas e 0,78 a 100 pg/ml para os machos), com o anticorpo e o marcador enzimático conjugado (AChE) ao esteróide, na quantidade recomendada pelo kit (50 µm, para todos). Durante a incubação (1 hora à temperatura ambiente para o E₂ e 18 horas a 4°C para o 11-KT) ocorreu

a ligação do antissoro ao antigénio e a competição entre o AChE e esteróide plasmático ao antissoro. Após o tempo de incubação, o conteúdo dos poços foi vertido e lavado 5 vezes com 250 µl da solução de lavagem. Em cada poço foi adicionado 200 µl do reagente Ellman's (substrato) (figura 9), para ocorrer uma reação catalítica com o AChE. A microplaca foi colocada num agitador orbital (1h30 min para o E₂ e 2 h para o 11-KT) para otimizar os resultados, recomendado pelo kit. A reação catalítica foi detetada pela leitura de absorvência, entre a 405 nm, num leitor de microplacas BioTeK Synergy HT pelo software Gen 5 2.00. A curva de calibração (curva logarítmica) foi obtida pelas soluções padrão e as concentrações das amostras foram determinadas através dessa curva (equação logarítmica).

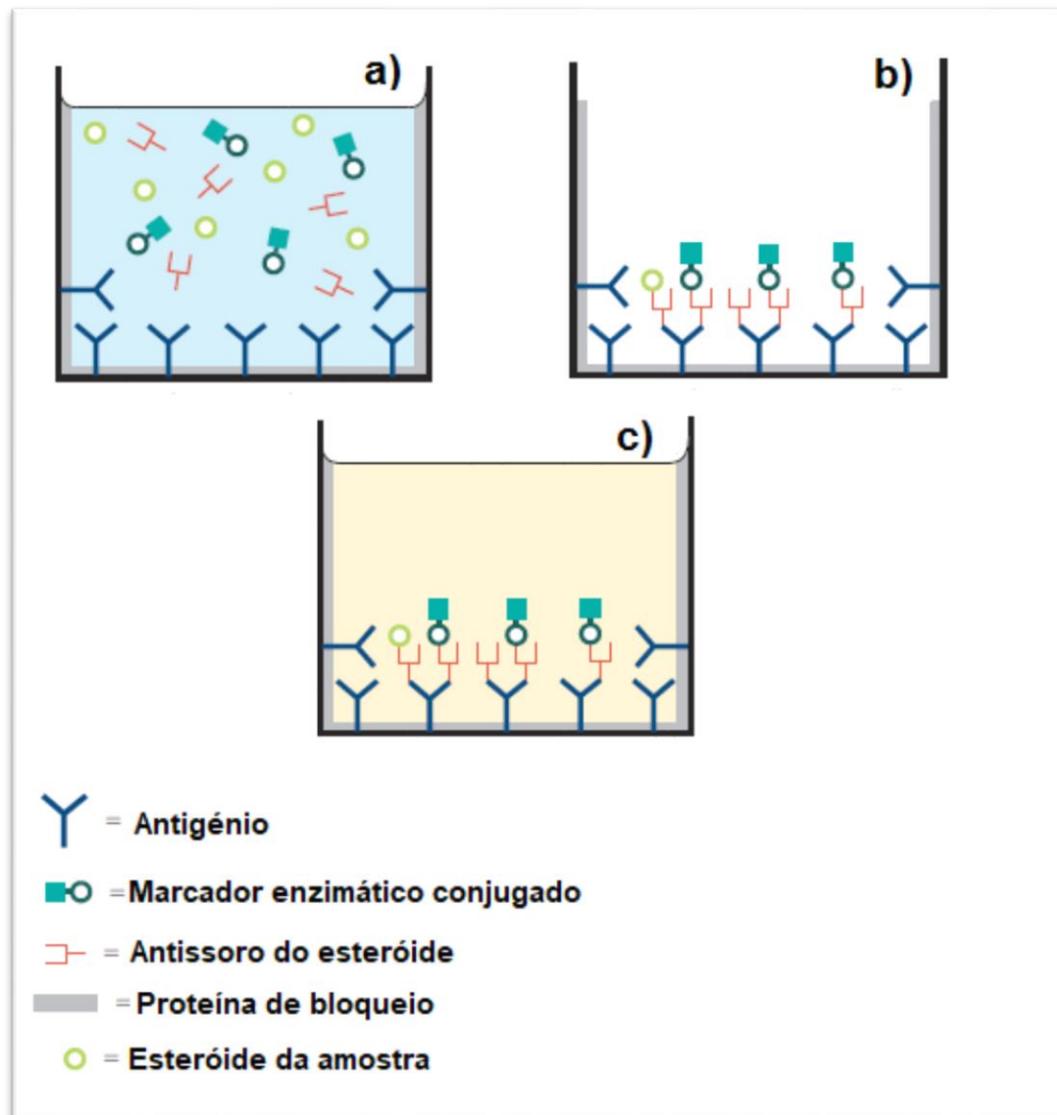


Figura 9 – Representação esquemática de um poço da microplaca do Kit ELISA para quantificação do esteróide (E_2 para às fêmeas e 11-KT para os machos), pelo método ELISA. a) Incubação do marcador enzimático conjugado (ligado ao esteróide a quantificar), do antissoro e a solução padrão ou esteróide da amostra; b) Lavagem do poço para remover os excessos do poço; c) Adição do reagente Ellman's (substrato) (adaptado do manual do Kit ELISA).

2.3. Análise de dados

Neste estudo foi avaliada a evolução temporal da proporção de indivíduos em cada um dos estados macroscópicos e microscópicos de maturação das gónadas. Paralelamente, foi também estudada a evolução temporal de três índices somáticos, nomeadamente o índice gonossomático (IGS), o índice hepatossomático (IHS) e o fator de condição de Fulton (K) (Htun-Han, 1978a; Rinchar and Kestemont, 1996).

O IGS consiste na relação entre o peso da gónada (Pg) e o peso total (Pt) do peixe, em gramas (g) (ver: equação 1) (Schreck and Moyle, 1990). Este é um método que permite identificar as variações temporais do peso das gónadas como acumulação de algumas proteínas e lípidos à medida que as gâmetas se desenvolvem, até à época de postura. Em estados de maturação avançados, o IGS atinge valores maiores (Ribeiro, 2002).

$$IGS = \frac{Pg}{Pt} \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

O IHS consiste na relação do peso do fígado (Pf) com o peso total (Pt) do peixe, em gramas (ver: equação 2) (West, 1990). Esta relação permite perceber a participação do fígado no processo de desenvolvimento das gâmetas. Este processo pode ocorrer em dois padrões distintos: nos peixes magros, a acumulação de lípidos ocorre a nível do fígado, em que o IHS aumenta consideravelmente antes da maturação; nos peixes gordos, a acumulação de lípidos ocorre a nível do músculo, em que os valores máximos do IHS coincide com os IGS (Ribeiro, 2002).

$$IHS = \frac{Pf}{Pt} \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

O K considera a relação do peso total (Pt), em gramas (g), com a variação do comprimento total (Ct) do peixe, em centímetros (cm) (ver: equação 3) (West, 1990), desta forma contribui um bom indicador do estado físico do peixe (ex.: estado nutricional do peixe) até à época de postura (Ribeiro, 2002).

$$K = \frac{Pt}{Ct^3} \times 100 \quad (\text{equação 3})$$

Com base na classificação dos estados microscópicos de maturação das gónadas, utilizou-se o método de Iles (Iles, 1964) para determinar a duração da época de postura de *P. flesus*. Segundo este método, a época de postura inicia-se quando 50% dos adultos está em estado de pré-postura ou postura (no caso de ser possível detetá-lo sem erro), e termina quando 50% dos adultos se encontram em pós-postura. Para as fêmeas, o estado de pré-postura (uma vez que não foi possível detetar fêmeas em postura) foi considerado como o estado vitelogénico tardio do ovário e, o período de pós-postura como o estado pós-desova do ovário. Nos machos, o período postura foi determinado pelo estado de maturação do testículo e, o estado de pós-postura foi determinado pelo estado pós-postura do testículo.

Para além da avaliação microscópica das gónadas, também se aplicou o método de Iles (Iles, 1964) na avaliação macroscópica das gónadas, no IGS e na concentração de esteroides sexuais. No caso da utilização da avaliação macroscópica das gónadas como indicador, considerou-se o estado de pré-postura das fêmeas como o estado vitelogénico do ovário e estado de pós-postura como o estado pós-desova do ovário; para os machos considerou-se o estado de postura como o estado de maturação do testículo e o estado de pós-postura como o estado de pós-postura ou regressão do testículo. No caso do IGS e dos esteroides sexuais foi necessário estimar um valor que fosse indicativo de cada um dos estados de maturação referidos no método de Iles (Iles, 1964). Assim, considerou-se como indicador o valor médio de cada parâmetro (IGS, 17β -estradiol e 11-cetotestosterona) para cada um dos estados de maturação (pré-postura para as fêmeas, postura para os machos e pós-postura para ambos os gêneros), apenas quando foram consideradas diferenças significativas. Para as fêmeas determinou-se o valor médio de IGS e de E_2 das fêmeas em estado de vitelogénico tardio e, todas as fêmeas com valor igual ou superior a esses valores médios foram classificadas como em pré-postura. Para o estado de pós-postura foi calculado o valor médio de IGS e de E_2 das fêmeas classificadas como em pós-desova microscopicamente e, todas as fêmeas com valor igual ou inferior a esses valores médios foram classificadas como estando em pós-postura. Para os machos seguiu-se o mesmo procedimento, mas estimou-se o valor médio de IGS e 11-KT dos machos em estado de postura.

Para investigar diferenças significativas entre os vários parâmetros estudadas (comprimento total; peso total; IGS; IHS; K; estados de maturação macro e microscópicos; esteroides sexuais) ao longo dos meses e entre os vários estados de maturação foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, sempre que as amostras não cumpriam os pressupostos da análise de variância (ANOVA), nomeadamente o princípio da normalidade e da homocedasticidade (Zar, 1996). O teste post-hoc utilizado foi o teste de Dunn. Foram também estimados os fatores de correlação de Spearman entre os vários parâmetros estudados (comprimento total; peso total; IGS; IHS; K; estados de maturação macro e microscópicos; esteroides sexuais). Para determinar a fator de correlação entre a classificação micro e macroscópica das gónadas com as restantes variáveis de estudo (IGS; IHS e K) foi necessário atribuir um número inteiro a cada um dos estados de maturação das gónadas (exemplo: estado vitelogénico como número 3 e estado vitelogénico tardio como número 4). Todas as correlações significativas e com um fator de correlação maior ou igual a 0,5 ($r \geq 0,5$) foram também representadas graficamente através de uma regressão linear simples, sempre que estas eram significativas ($p < 0,05$). Todos os testes foram realizados com *software* R 3.4.1.

***Capítulo III* - Resultados**

Entre novembro de 2016 e maio de 2017 foram capturadas 267 solhas, sendo que 217 eram fêmeas (81 %) e 50 eram machos (19%), com um *sex-ratio* de 1:4, ou seja, 1 macho para cada 4 fêmeas. O comprimento total de todos os peixes capturados variou entre 22,90 e 47,10 cm e o peso total variou entre 158,84 e 1112,12 g.

3.1. Fêmeas

No estuário do rio Douro foram capturadas 217 fêmeas de solha, com um comprimento total que variou entre 25,00 cm e 47,10 cm e um peso total entre 158,85 e 1112,12 g (tabela 5).

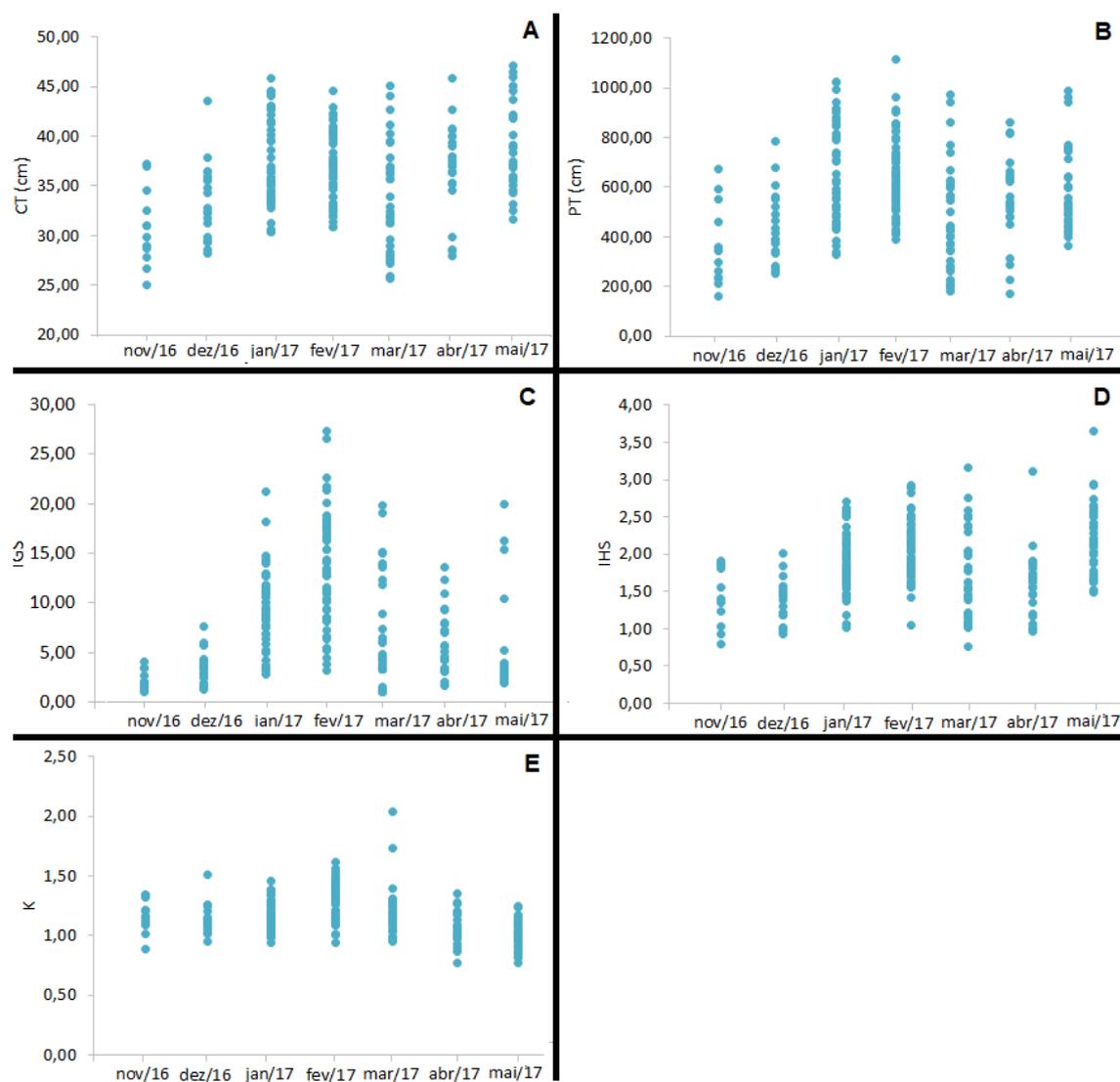


Figura 10 – Evolução mensal do comprimento total (A), peso total (B) e dos vários índices somáticos (C, D e E) das fêmeas de solha do estuário do rio Douro. CT: comprimento total; PT: peso total; IGS: índice gonodossomático; IHS: índice hepatossomático; K: Fator de condição.

A evolução mensal mostrou uma grande variabilidade no comprimento total das fêmeas de solha dentro de cada mês de estudo (figura 10A). A média do comprimento total variou entre $30,85 \pm 3,86$ cm e $38,71 \pm 4,34$ cm e, a mediana variou entre 30,40 e 37,95 cm, ao longo dos meses de estudo (tabela 5). As fêmeas de menor dimensão (CT < 30 cm) só estiveram presentes no estuário nos meses de novembro, dezembro e março (figura 10A) (tabela 5), sendo os comprimentos totais significativamente inferiores (Kruskal-Wallis H= 40,65, $p < 0,05$) aos das fêmeas dos restantes meses (janeiro, fevereiro, abril e maio) (tabela A – anexo).

No peso total das fêmeas de solha, a evolução mensal também demonstrou uma grande variabilidade de pesos dentro de cada mês de estudo (figura 10B). A média do peso total variou entre $364,90 \pm 166,43$ e $643,99 \pm 202,12$ g e, a mediana variou entre 321,14 e 617,09 g, ao longo dos meses de estudo (tabela 5). No mês de novembro, dezembro e março, as fêmeas apresentaram o menor peso total em relação aos restantes meses de estudo (tabela 5). A partir do mês de janeiro as fêmeas de solha apresentaram um peso total significativamente superior (Kruskal-Wallis H= 42,64, $p < 0,05$) ao peso total dos restantes meses do estudo, exceto no mês de março, como se verificou anteriormente (tabela B – anexo).

Tabela 5 – Intervalos do comprimento total (CT) em centímetros (cm) e do peso total (PT) em gramas (g) com as respetivas médias (Méd), desvios padrões (DP), medianas (Md) e o número de fêmeas analisadas (n) no período de estudo. Nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

Mês	n	CT (cm)			PT (g)		
		Mín-Máx.	Méd±DP	Md	Mín-Máx	Méd±DP	Md
nov/16	12	25,00-37,20	$30,85 \pm 3,86$	30,40	158, 84-671,00	$364,90 \pm 166,43$	321,14
dez/16	20	28,20-43,50	$33,29 \pm 3,83$	32,60	253,32-782,17	$433,14 \pm 149,08$	402,37
jan/17	45	30,40-45,80	$37,60 \pm 4,46$	36,30	328,70-1025,20	$643,99 \pm 202,12$	593,83
fev/17	55	30,80-44,50	$36,68 \pm 3,37$	36,80	387,97-1112,12	$643,64 \pm 157,59$	617,07
mar/17	33	25,70-45,10	$33,53 \pm 5,60$	32,40	180,00-974,00	$474,49 \pm 216,41$	428,00
abr/17	22*	28,00-45,80	$36,74 \pm 4,65$	37,30	168,37-858,14	$550,25 \pm 183,84$	551,76
mai/17	30	31,60-47,10	$38,71 \pm 4,34$	37,95	364,85-987,53	$593,21 \pm 168,09$	534,06

*No mês de abril de 2017 só foram capturadas 22 solhas no estuário do rio Douro.

O IGS das fêmeas de solha variou entre 0,97 a 27,22 nos meses de estudo, com uma grande variabilidade dentro de cada mês a partir do mês de janeiro (figura 10C). A média e a mediana do IGS variaram entre $2,23 \pm 0,98$ e $13,49 \pm 5,47$ e 1,95 e 13,18, respetivamente, ao longo dos meses de estudo (tabela 6). A evolução mensal mostrou um aumento deste índice a partir de

novembro até fevereiro e, um decréscimo a partir deste mês até ao final dos meses de estudo (figura 10C). Em fevereiro as fêmeas de solha apresentaram um IGS significativamente superior (Kruskal-Wallis, $H=108,17$, $p<0,05$) em comparação com os restantes meses de estudo (tabela C – anexo).

O IHS das fêmeas de solha variou entre 0,76 a 3,66 ao longo dos meses de estudo (figura 10D), com uma grande variabilidade dentro de cada mês (tabela 6). A média e a mediana do IHS variaram entre $1,34\pm 0,31$ e $2,21\pm 0,50$ e 1,34 e 2,16, respetivamente (tabela 6). Este índice foi significativamente mais elevado (Kruskal-Wallis, $H=63,04$, $p<0,05$) no mês de janeiro, fevereiro e maio (figura 10D) (tabela D – anexo).

O fator de condição das fêmeas de solha variou entre 0,77 a 2,03 ao longo dos meses de estudo (figura 10E), com uma grande variabilidade dentro de cada mês (tabela 6). A média e a mediana do fator de condição variaram entre $1,14\pm 0,12$ e $1,30\pm 0,16$ e, 1,11 e 1,31, respetivamente (tabela 6). No mês de fevereiro, as solhas fêmeas apresentaram uma condição geral significativamente superior (Kruskal-Wallis, $H=65,83$, $p<0,05$) aos restantes meses de estudo (tabela E – anexo). Contrariamente a maio, quando a condição das fêmeas foi significativamente inferior (Kruskal-Wallis, $H=65,83$, $p<0,05$) ao fator de condição nos restantes meses, exceto abril (tabela E – anexo).

Tabela 6 – Intervalos (Min-Máx) dos índices somáticos com as respetivas médias (Méd), desvios padrões (DP) e medianas (Md) de fêmeas no período da amostragem. IGS: índice gonodossomático; IHS: índice hepatossomático; K: Fator de condição; nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

Mês	IGS			IHS			K		
	Mín – Máx.	Méd ± DP	Md	Mín – Máx.	Méd ± DP	Md	Mín – Máx.	Méd ± DP	Md
nov/16	0,98-4,12	2,23 ±0,98	1,95	0,79-1,90	1,47 ±0,40	1,47	0,89-1,35	1,16 ±0,14	1,15
dez/16	1,31-7,59	3,54 ±1,72	3,45	0,94-2,02	1,34 ±0,31	1,34	0,95-1,51	1,14 ±0,12	1,11
jan/17	2,73-21,22	9,61 ±3,87	9,32	1,02-2,70	1,91 ±0,44	1,83	0,94-1,46	1,18 ±0,12	1,18
fev/17	3,18-27,34	13,49 ±5,47	13,18	1,04-2,93	2,07 ±0,40	2,06	0,93-1,61	1,30 ±0,16	1,31
mar/17	0,97-19,88	6,84 ±5,56	4,61	0,76-3,17	1,71 ±0,59	1,54	0,95-2,04	1,20 ±0,21	1,16
abr/17	1,66-13,62	6,24 ±3,28	5,33	0,96-3,10	1,58 ±0,47	1,59	0,77-1,35	1,07 ±0,15	1,04
mai/17	1,85-19,98	4,47 ±4,63	2,74	1,49-3,66	2,21 ±0,50	2,16	0,77-1,25	1,01 ±0,12	1,01

3.1.1. Avaliação macroscópica

Dos 5 estados de maturação do ovário descritos na tabela 1, foram observados 4 estados, nomeadamente: o estado de repouso (REP) (figura 11A), o estado pré-vitelogénico (PRE) (figura 11B), o estado vitelogénico (VIT) (figura 11C) e o estado pós-desova (POS) (figura 11D). O estado de maturação (MAT) nunca foi detetado durante os meses de estudo.

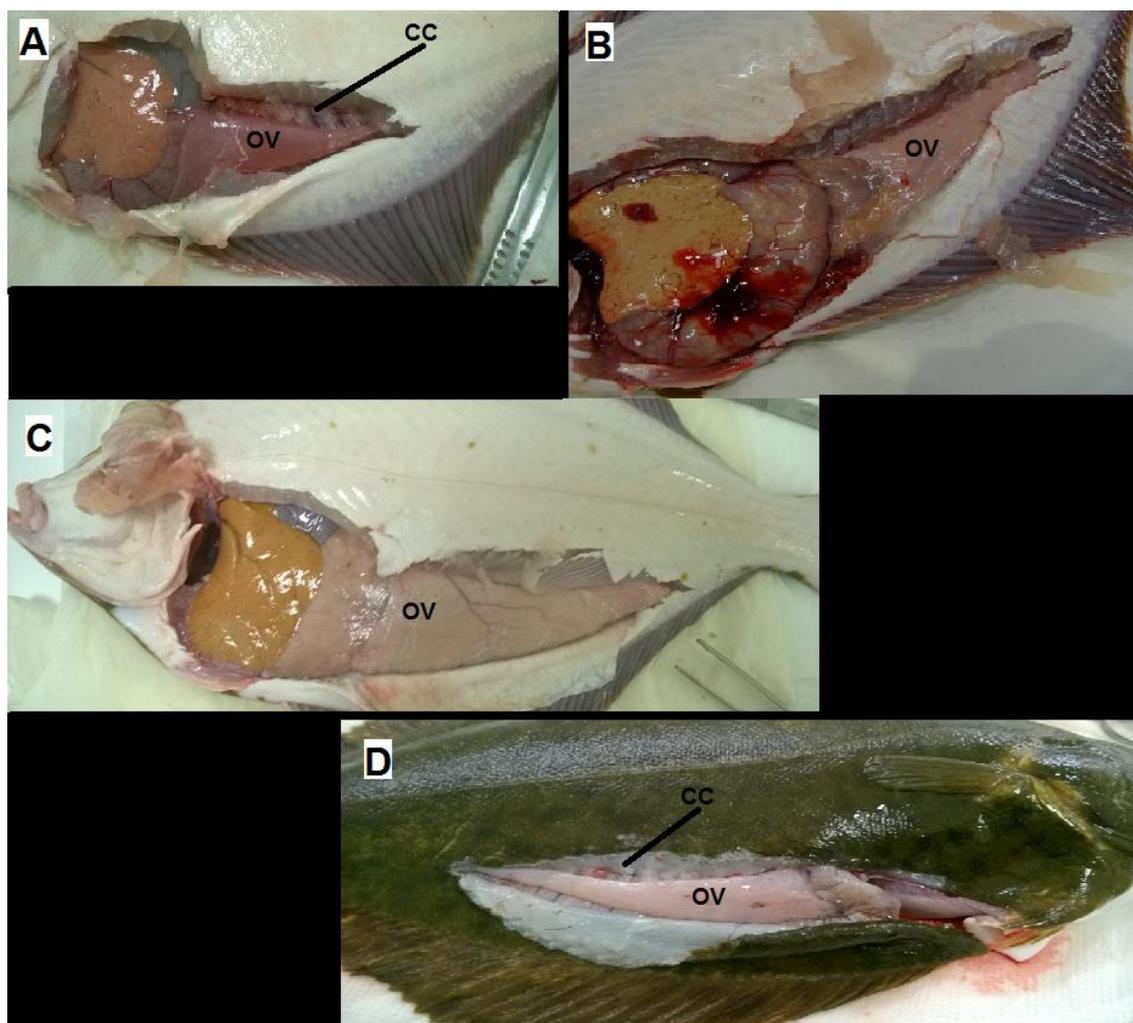


Figura 11 – Classificação macroscópica dos vários estados de maturação do ovário de *P. flesus* do estuário do rio Douro; A: Estado de repouso; B: Estado de pré-vitelogénico; C: Estado vitelogénico; D: Estado pós-desova; CC: cavidade corporal; OV: Ovário.

Durante o período de estudo, o estado REP foi detetado em novembro (n=6), dezembro (n=2), março (n=5) e maio (n=1) (figura 12). No entanto, a maior percentagem de fêmeas neste estado ocorreu no mês de novembro (50%). Durante todos os meses de estudo foram observadas solhas com ovários em estado PRE (novembro, n=6; dezembro e janeiro, n=3; fevereiro e abril, n=1), com a exceção dos meses de março (n=0) e maio (n=0). Tal como o estado anterior de maturação, também foi em novembro que se observou a maior percentagem de fêmeas em estado PRE (50%). O estado VIT foi detetado no mês de dezembro (n=15), janeiro (n=42), fevereiro (n=53), março (n=19), abril (n=6) e maio (n=6). Mas a maior percentagem de fêmeas com gónadas no estado VIT foi observado nos meses de janeiro (93%) e fevereiro (96%). Por fim, o estado POS só foi visualizado no mês de fevereiro (n=1), março (n=9), abril (n=15) e maio (n=23), sendo o mês de maio (77%), o mês com maior percentagem de indivíduos neste estado de maturação (figura 12).

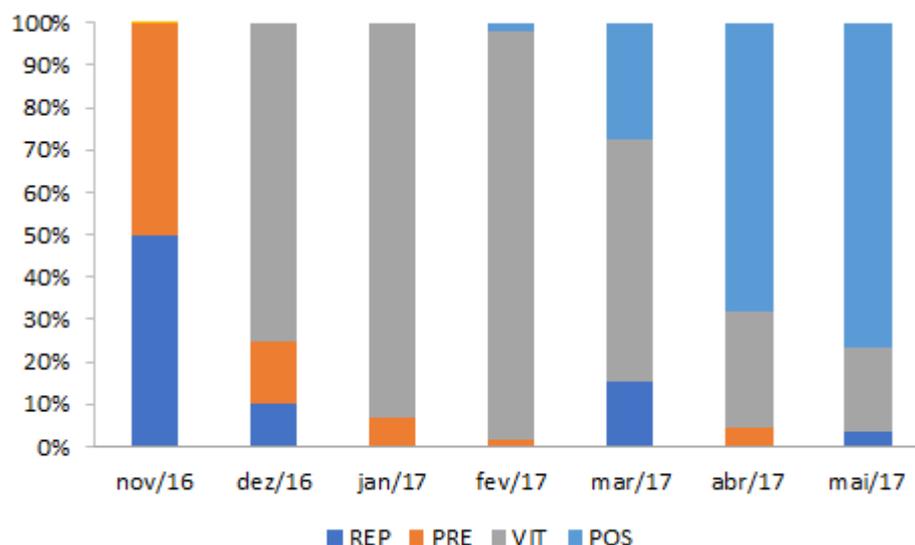


Figura 12 – Proporção dos estados de maturação dos ovários de *P. flesus* para cada mês de amostragem por avaliação macroscópica. REP: Estado de Repouso, PRE: Estado pré-vitelogénico; VIT: Estado vitelogénico; POS: Estado de pós-desova; nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

3.1.2. Avaliação microscópica

A avaliação microscópica dos estados de maturação do ovário de *P. flesus* foi efetuada em 57 fêmeas, cujo comprimento total variou entre 27,80 a 44,30 cm e o IGS entre 1,17 a 27,34.

3.1.2.1. Descrição do ovário

As fêmeas de *P. flesus* apresentaram uma estrutura típica do ovário, com várias lamelas ou finas camadas de tecido conjuntivo nas células germinativas. Foram observados 7 estados de desenvolvimento das células germinativas, nomeadamente:

- as ovogónias (OVG): pequenas células arredondadas com o citoplasma bastante pequeno e o núcleo destacável pelo seu tamanho e pelo seu único nucléolo (figura 13A);
- oócitos primários (OP): relativamente maiores do que a OVG, mas o citoplasma dos OP bastante mais basofílicos (figura 13A), provavelmente associados ao aumento dos conteúdos no citoplasma;
- oócitos perinucleolares (OPN): relativamente maiores e mais basofílicos do que os OP e caracterizados por um grande número de nucléolos na periferia do núcleo (figura 13A);

- oócitos perinucleolares tardios (OPNT): maiores do que os OPN e normalmente com citoplasma menos basofílico do que os OPN (figura 13A);
- oócitos com os alvéolos corticais (OAC): caracterizados pelo aparecimento dos alvéolos corticais na periferia do núcleo (figura 13B);
- oócitos vitelogénicos (OV): caracterizados pela existência de grânulos de vitelo que ocupam quase todo o citoplasma (figura 13B) e o número de nucléolos elevado, dispersos pelo núcleo; e
- oócitos vitelogénicos tardios (OVT): relativamente maiores do que OV, devido à elevada concentração de grânulos de vitelo armazenados no citoplasma do oócito e com um maior número de núcleos do que as OV dispersos pelo núcleo (figura 14).

De uma forma geral, nos OAC, OV e OVT foi possível detetar com maior definição as camadas de células granulosa e teca em torno das células germinativas. Também foi possível detetar a zona radiata, apesar desta ser relativamente mais espessa nos OVT do que nos restantes estados.

Nos ovários classificados em pós-desova foram observados folículos pós-desova ou ovulatórios, constituídos por células foliculares residuais que permaneceram no ovário (ver figura 15E).

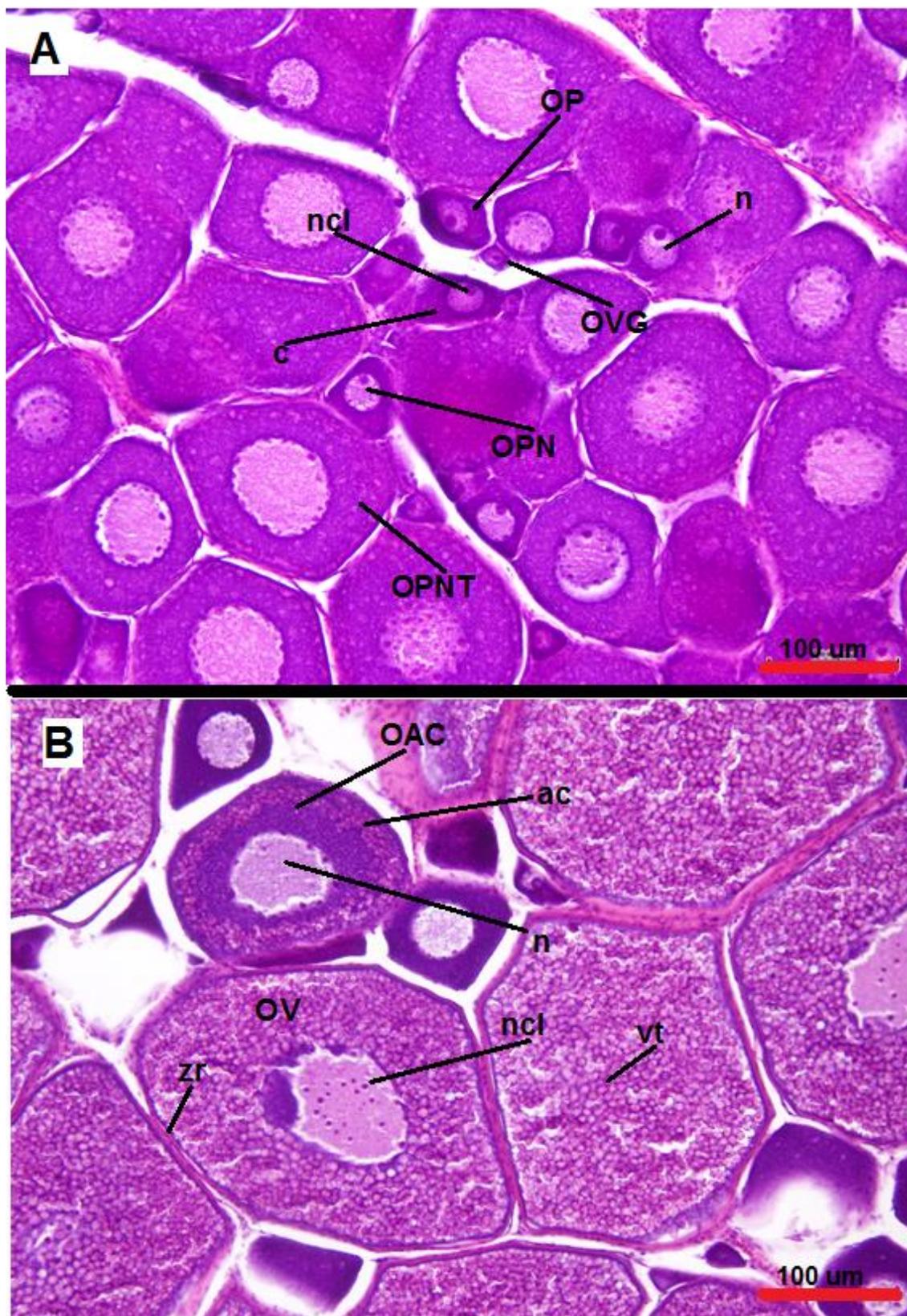


Figura 13 – Alguns aspetos histológicos de várias células germinativas dos ovários de *P. fesus*, como o citoplasma C ou núcleo (n) com os nucléolos (ncl), grânulos de vitelo (vt), alvéolos corticais (ac). A) Representação microscópica (100 µm) das ovogônias (OVG), oócito primário (OP), oócito perinucleolar (OPN) e oócito perinucleolar tardio (OPNT). B) Representação microscópica (100 µm) dos oócitos com os alvéolos corticais (OAC) e da oócito vitelogénico (OV).

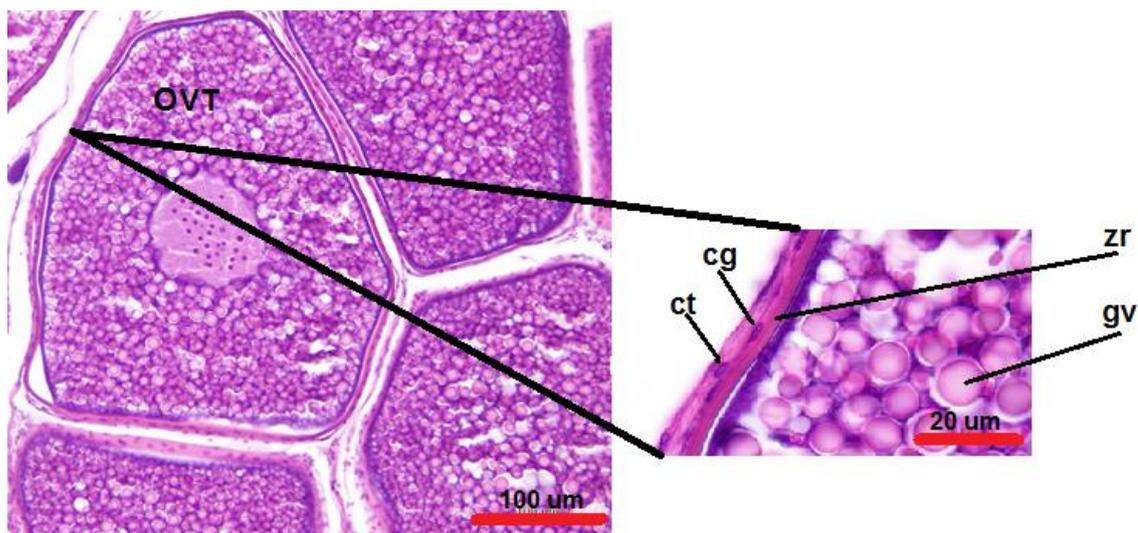


Figura 14 – Fotografia microscópica (100 µm) dos oócitos vitelogénicos tardios (OVT) de *P. flesus*. Do lado direito da imagem é apresentado um zoom (aumentado 20 µm) onde é possível observar alguns pormenores da célula numa escala microscópica mais pequena; ct: célula teca; cg: célula granulosa; zr: zona radiata; gv: grânulo de vitelo.

Com base nos critérios definidos na tabela 1 avaliou-se o estado de maturação do ovário, considerando normalmente o estado mais avançado das células germinativas presentes no ovário. Assim, as fêmeas de solha estudadas foram classificadas em 5 estados de maturação, nomeadamente: estado de repouso (REP) (figura 15A), estado pré-vitelogénico (PRE) (figura 15B), estado vitelogénico (VIT) (figura 15C), estado vitelogénese tardia (VITT) (figura 16D) e em estado pós-desova (POS) (figura 15E).

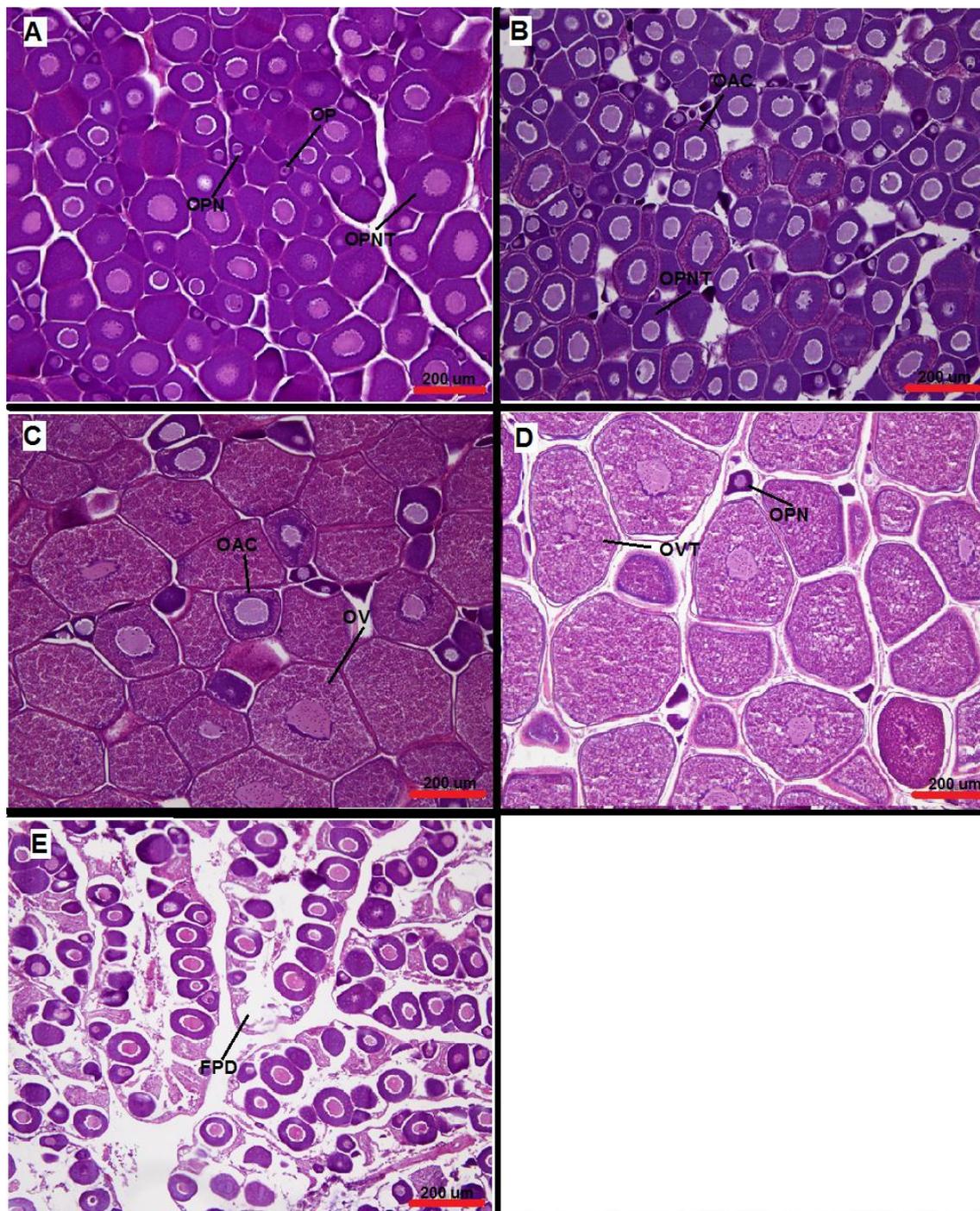


Figura 15 – Avaliação microscópica dos estados de maturação do ovário de *P. flesus* do estuário do rio Douro (200 µm). A: REP (estado de repouso); B: PRE (estado pré-vitelogénico); C: VIT (estado vitelogénico); D: VITT (estado vitelogénico tardio); E: POS (estado pós-desova); OP: oócito primário; OPN: oócito perinucleolar; OPNT: oócito perinucleolar tardio; OV: oócito vitelogénico; OVT: oócito vitelogénico tardio; FPD: folicúlos da pós-desova.

3.1.2.2. Evolução mensal dos estados de maturação do ovário

O estado REP, caracterizado pela presença de OPNT, foi observado ao longo do período da amostragem (novembro, n=3; dezembro e março, n=2; e maio de 2017, n=1), exceto no mês de janeiro (n=0), fevereiro (n=0) e abril (n=0) e, com a maior percentagem em novembro (43% das fêmeas) (figura16). O estado PRE, caracterizado pela presença dos OAC, foi detetado a partir de novembro de 2016 (n=4), dezembro (n=1), janeiro de 2017 (n=2), fevereiro de 2017 (n=1) e abril (n=1), apresentando também uma maior percentagem em novembro (57% das fêmeas). O estado VIT, caracterizado pela presença dos OV, foi observado nos meses de dezembro (n=6), janeiro (n=2), fevereiro de 2017 (n=2) e março (n=2), apresentando uma maior percentagem em dezembro (67% das fêmeas). O estado VITT, caracterizado pela presença dos OVT, foi observado nos meses de janeiro (n=6), fevereiro (n=9), março (n=2), abril (n=3) e maio (n=2), mas a maior percentagem foi observada no mês de fevereiro, quando 69% das fêmeas apresentou ovários em estado VITT de maturação. O estado POS, caracterizado pela presença dos folículos pós-desova, só foi observado no mês de fevereiro (n=1), março (n=3), abril (n=1) e maio (n=1), com a maior percentagem em março (33%) (Figura 16).

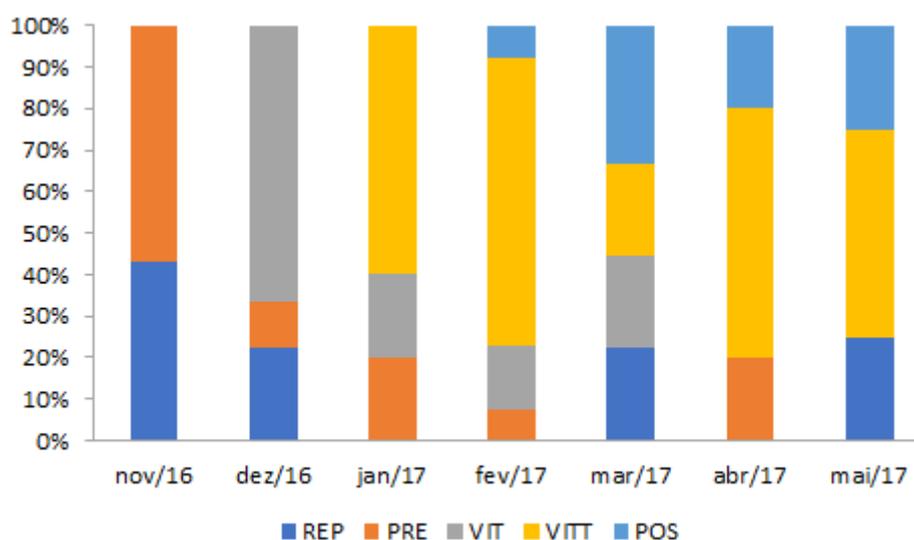


Figura 16 - Proporção dos estados de maturação dos ovários de *P. flesus* para cada mês de amostragem classificados por avaliação microscópica. REP: Estado de Repouso, PRE: Estado pré-vitelogénico; VIT: Estado vitelogénico; VITT: Estado vitelogénico tardio; POS: Estado de pós-desova; nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

3.1.2.3. Variação dos índices somáticos com os estados maturação do ovário

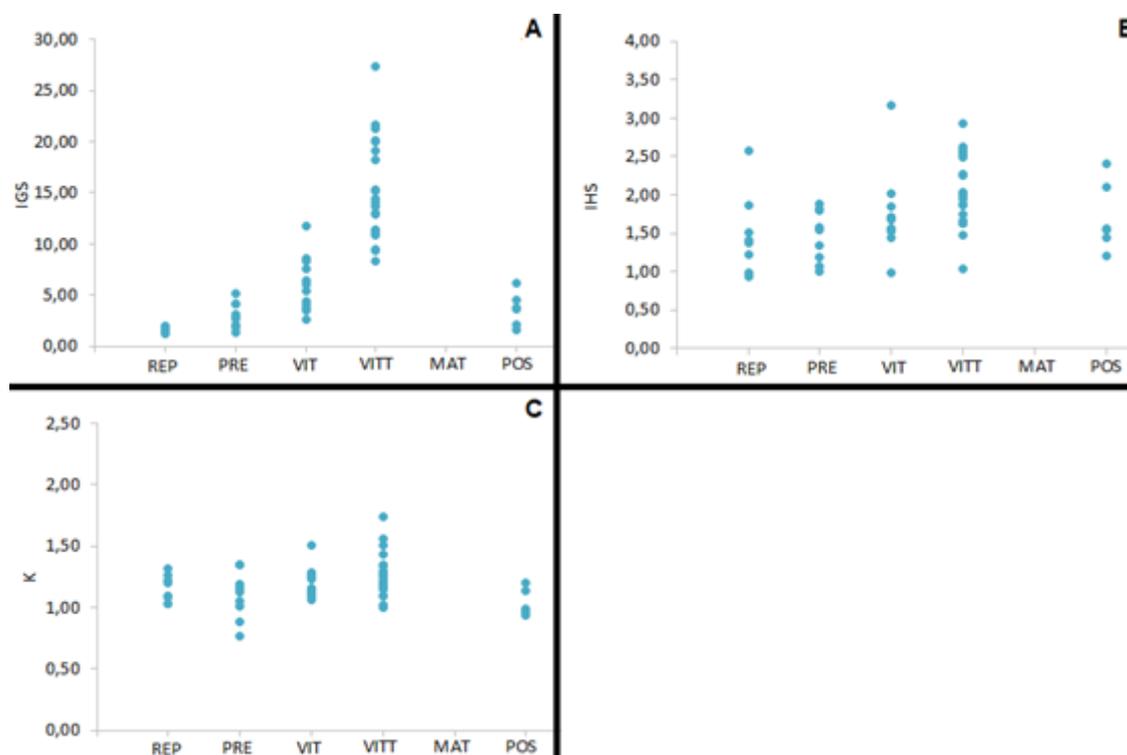


Figura 17 – Distribuição dos vários índices somáticos pelos estados microscópicos de maturação do ovário. IGS: índice gonodossomático (A); IHS: índice hepatossomático (B); K: Fator de condição (D); REP: Estado de Repouso, PRE: Estado pré-vitelogénico; VIT: Estado vitelogénico; VITT: Estado vitelogénico tardio; POS: Estado de pós-desova.

O IGS das fêmeas teve o maior valor médio e da mediana no estado VITT e os menores valores médios e das medianas no estado REP, PRE e POS (tabela 7). De modo que o IGS das fêmeas no estado VITT foi significativamente superior (Kruskal-Wallis, $H= 46.32$, $p< 0,05$) ao IGS das solhas com ovários nos demais estados de maturação (figura 17A; tabela M - anexo). Por outro lado, o IGS das fêmeas em estado PRE foi significativamente inferior (Kruskal-Wallis, $H= 46.32$, $p< 0,05$) ao IGS das fêmeas no estado VIT e no estado VITT.

O IHS das fêmeas apresentou uma grande variabilidade nos vários estados de maturação do ovário (figura 17B). Este índice apresentou o maior valor médio e da mediana no estado VITT e os menores valores médios e das medianas no estado REP, PRE e POS (tabela 7). De facto, o IHS das fêmeas no estado VITT foi significativamente superior (Kruskal-Wallis, $H= 15.17$, $p< 0,05$) ao IHS das fêmeas nos restantes estados maturação do ovário (tabela N - anexo).

O fator de condição das fêmeas de solha apresentou uma pequena variabilidade no estado POS (figura 17C), apresentando o menor valor médio e da mediana em comparação com os restantes estados de maturação (tabela 7). As fêmeas em POS apresentaram um fator k significativamente inferior (Kruskal-Wallis, $H= 10,40$; $p< 0,05$) ao de todas as outras fêmeas (tabela O - anexo).

Tabela 7 – Número de fêmeas e intervalos dos índices somáticos, com as respetivas médias (Méd), desvios padrões (DP) e medianas (Md) das fêmeas nos vários estados microscópicos de maturação do ovário. IGS: índice gonodossomático (A); IHS: índice hepatossomático (B); K: Fator de condição (C); REP: Estado de Repouso, PRE: Estado pré-vitelogénico; VIT: Estado vitelogénico; VITT: Estado vitelogénico tardio; POS: Estado de pós-desova.

	N	IGS			IHS			K		
		Min-Máx	Méd ±DP	Md	Min-Máx	Méd ±DP	Md	Min-Máx	Méd ±DP	Md
REP	8	1,17-1,98	1,58 ±0,28	1,54	0,94-2,58	1,48 ±0,53	1,39	1,03-1,32	1,16 ±0,11	1,15
PRE	9	1,31-5,21	3,05 ±1,26	2,73	1,01-1,88	1,47 ±0,33	1,55	0,77-1,35	1,10 ±0,19	1,13
VIT	12	2,68-11,78	6,04 ±2,66	5,70	0,99-3,17	1,73 ±0,52	1,62	1,06-1,51	1,21 ±0,12	1,20
VITT	22	8,37-27,34	14,97 ±4,91	13,82	1,04-2,93	2,06 ±0,47	2,00	1,00-1,74	1,25 ±0,18	1,21
POS	6	1,66-6,12	3,65 ±1,61	3,74	1,21-2,41	1,71 ±0,45	1,55	0,94-1,20	1,04 ±0,11	0,99

De acordo com os resultados das correlações de Spearman, apenas a avaliação macroscópica dos estados de maturação das gónadas esteve significativamente e positivamente correlacionada ($r=0,92$; $p<0,05$) com a avaliação microscópica e com o IGS ($r=0,50$, $p<0,05$) (tabela 8). Todas as restantes correlações apesar de significativas apresentaram um fator de correlação baixo ($r< 0,5$), não sendo, portanto, consideradas.

Tabela 8 – Fatores de correlação de Spearman entre a avaliação macroscópica dos estados de maturação dos ovários e restantes variáveis de estudo.

	Classificação macroscópica
Índice hepatossomático	0,32*
Índice gonodossomático	0,50*
Fator de condição	-0,07
Classificação microscópica	0,92*

*valor significativo ($p<0,05$)

Na relação entre os vários estados de maturação do ovário, a avaliação microscópica correspondeu a todos os estados da avaliação macroscópica, exceto o estado VITT, uma vez que não foi possível detetar a olho nú.

3.1.3. 17 β -Estradiol

Num total de 57, apenas não foi possível quantificar a concentração de E₂ no plasma sanguíneo de 3 fêmeas de solha (total de 54), pois os níveis de E₂ estavam abaixo do nível de deteção do kit ELISA.

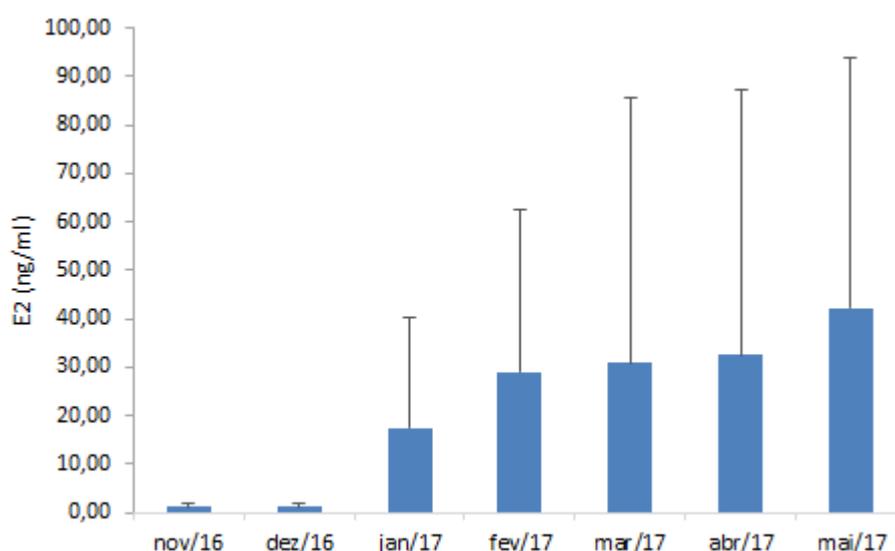


Figura 18 – Evolução do valor médio da concentração de 17 β - estradiol (E₂) com os respetivos desvios padrão ao longo dos meses de estudo. nov/16: novembro de 2016 (n=6); dez/16: dezembro de 2016 (n=9); jan/17: janeiro de 2017 (n=10); fev/17: fevereiro de 2017 (n=12); mar/17: março de 2017 (n=8); abr: abril de 2017 (n=5) mai/17: maio de 2017 (n=4).

A concentração de E₂ no plasma das fêmeas de solha variou entre 0,28 a 127,49 ng/ml (tabela 9). Apesar de uma ligeira tendência para um aumento do valor médio e da mediana ao longo dos meses de estudo (tabela 9), a concentração de E₂ não apresentou diferenças significativas entre os meses de estudo (Kruskal-Wallis, H= 6,96; p> 0,05) (tabela F - anexo).

Tabela 9 – Número e fêmeas e dos intervalos (mín-máx) do 17 β -estradiol (E₂), com as respetivas médias (méd), desvio padrão (DP) e medianas (Md) ao longo dos meses da amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; mai/17: maio de 2017.

		E ₂ (ng/ml)		
	<i>n</i>	<i>Mín-Máx.</i>	<i>Méd±DP</i>	<i>Md</i>
nov/16	6	0,90-1,93	1,14±0,62	1,08
dez/16	9	0,88-1,82	1,08±0,62	1,34
jan/17	10	0,63-74,76	17,37±23,08	9,77
fev/17	12	0,32-94,27	29,11±33,42	20,10
mar/17	8	0,64-127,49	30,80±54,89	1,58
abr/17	5	0,26-76,80	32,49±54,89	36,69
mai/17	4	0,28-106,71	42,26±51,74	31,03

A concentração E₂ no plasma foi, em média, mais elevada nas fêmeas em estado VITT e menor nas fêmeas em estado POS (figura 19 e tabela 10).

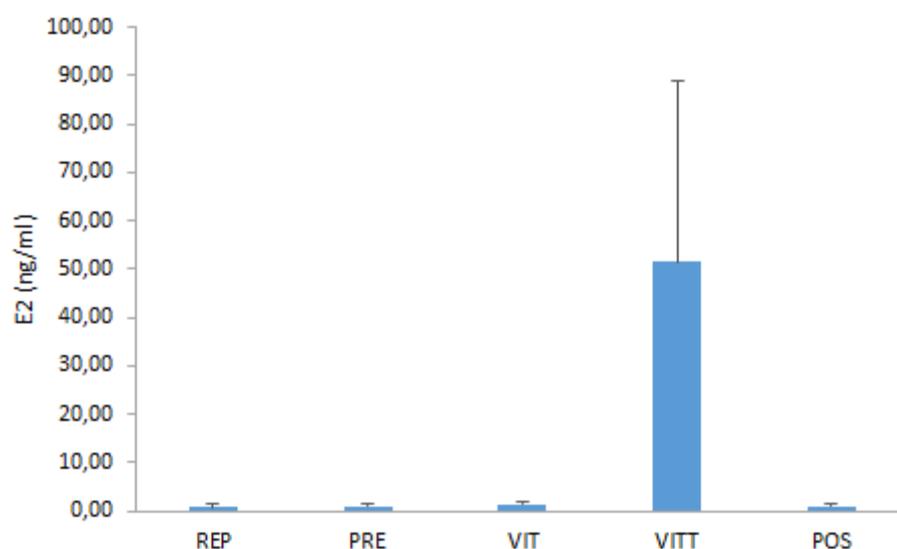


Figura 19 – Evolução do valor médio da concentração de 17 β - estradiol (E₂) com os respetivos desvios padrão ao longo dos estados microscópicos de maturação.

De facto, a concentração deste esteroide no estado VITT foi significativamente superior (Kruskal-Wallis, H= 34,65; p< 0,05) às concentrações do E₂ no plasma sanguíneo das fêmeas nos restantes estados de maturação (tabela P - anexo).

Tabela 10 – Número de fêmeas e os intervalos mínimo e máximo de 17β- estradiol (E₂), com as respetivas médias, desvios padrões (DP) e medianas (Md) nos vários estados microscópicos de maturação do ovário REP: Estado de Repouso, PRE: Estado pré-vitelogénico; VIT: Estado vitelogénico; VITT: Estado vitelogénico tardio; POS: Estado de pós-desova

	N	E ₂ (ng/ml)		
		Min-Máx	Méd±DP	Md
REP	8	0,19-1,94	0,77±0,57	0,65
PRE	8	0,11-1,81	1,00±0,55	0,90
VIT	11	0,63-2,21	1,46±0,45	1,47
VITT	21	0,32-127,49	51,52±37,35	42,44
POS	6	0,26-1,89	0,87±0,62	0,77

De acordo com os resultados das correlações de Spearman, verificou-se existir uma correlação positiva entre a concentração de E₂ no plasma e o IGS (R=0,85; p<0,05) das fêmeas (tabela 11).

Tabela 11 – Fatores de correlações de Spearman entre 17β- estradiol (E₂) e restantes variáveis das fêmeas.

	E ₂ (ng/ml)
<i>Comprimento total</i>	0,33*
<i>Peso total</i>	0,46*
<i>Índice hepatossomático</i>	0,51*
<i>Índice gonodossomático</i>	0,85*
<i>Fator de condição</i>	0,54*
<i>Classificação macroscópica</i>	0,31*
<i>Classificação microscópica</i>	0,46*

*valor significativos (p<0,05)

As concentrações de E₂ aumentaram com o aumento IGS das fêmeas de solha, descritas por uma relação linear significativa ($y=3,95x-11,70$; $R^2=0,60$; $p<0,05$) entre a concentração de E₂ e o IGS (figura 20).

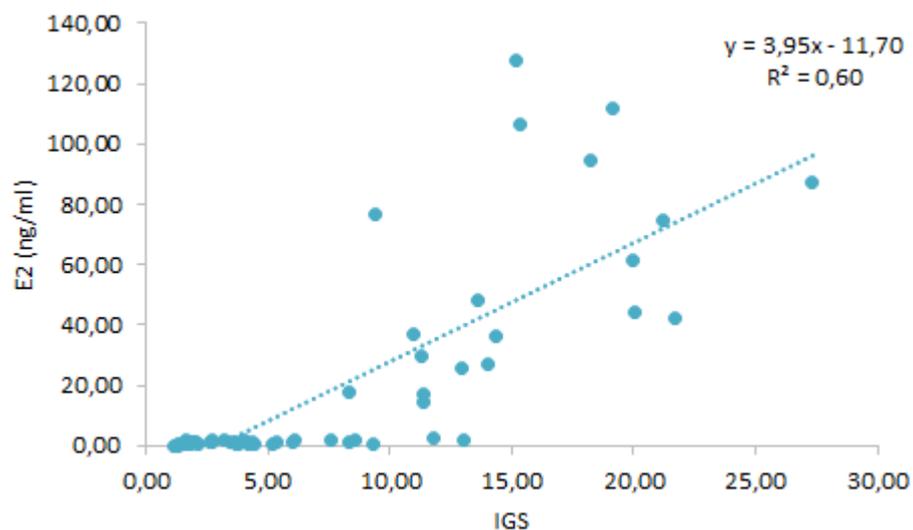


Figura 20 – Relação entre as concentrações de 17β-estradiol (E₂) com o índice gonodossomático (IGS) ($y=3,95x-11,70$; $R^2= 0,60$, $p< 0,05$).

3.2. Machos

Ao longo do estudo só foram capturados machos de solha no estuário do rio Douro entre os meses de novembro e março, num total de 50 machos. O comprimento total dos machos de solha variou entre 25,40 e 36,50 cm e o peso total variou entre 170,14 e 567,47 g.

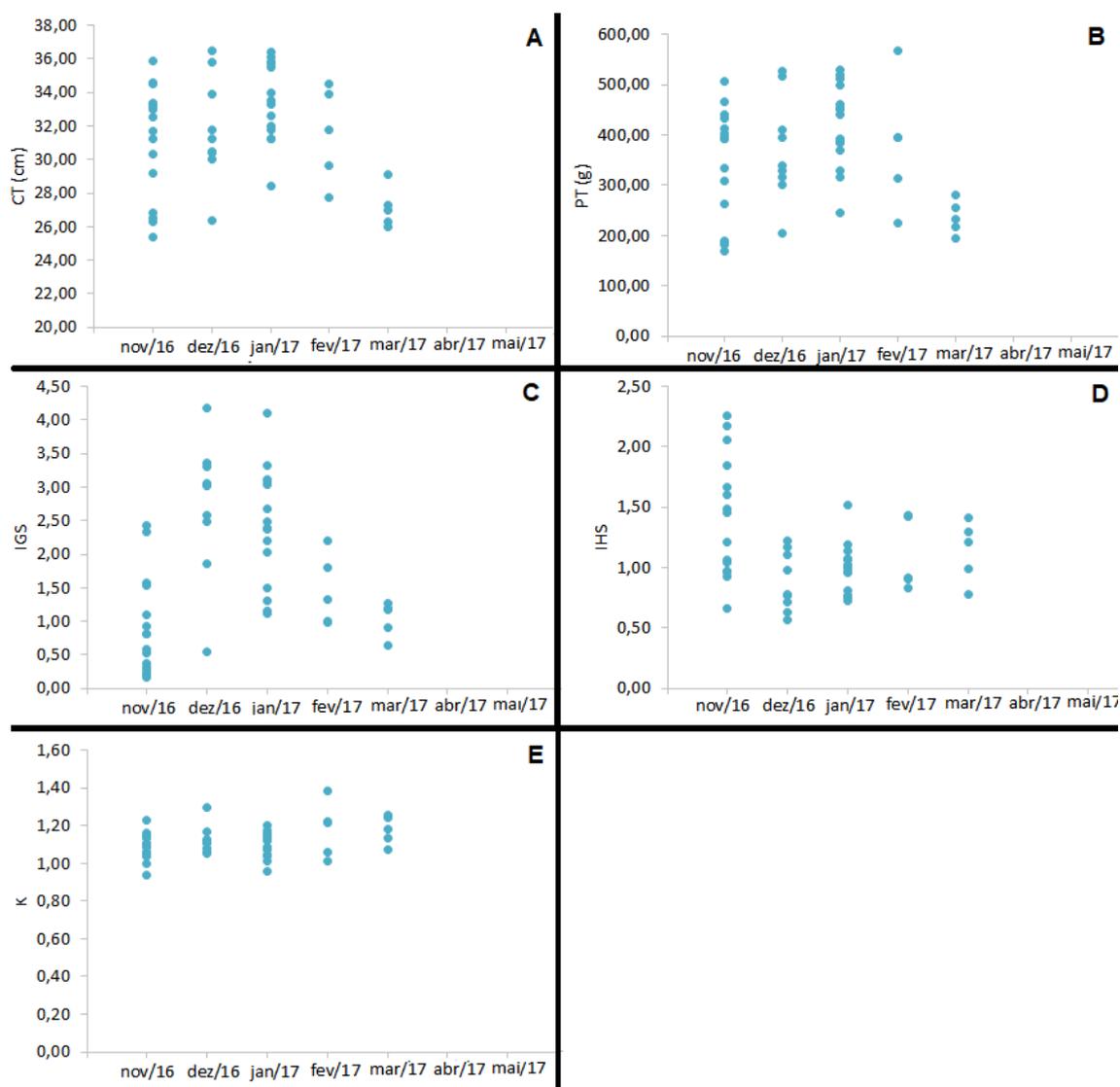


Figura 21 - Evolução mensal do comprimento total (A), peso total (B) e dos vários índices somáticos (C, D e E) dos machos de solha do estuário do rio Douro. CT: comprimento total; PT: peso total; IGS: índice gonodossomático; IHS: índice hepatossomático; K: Fator de condição.

A evolução mensal mostrou uma grande variabilidade no comprimento total dos machos de solha dentro de cada mês de estudo, exceto no mês de março de 2017 (figura 21A). A média e a mediana de comprimento variaram entre $27,14 \pm 1,21$ e $33,55 \pm 2,25$ cm e 27,00 e 33,50 cm, respetivamente, ao longo dos meses de estudo (tabela 12). Os machos de menor dimensão ($CT < 26$ cm) só estiveram presentes nos meses de novembro, dezembro e março (figura 21A). O tamanho dos machos no mês de março foi significativamente inferior (Kruskal-Wallis $H=13,66$; $p < 0,05$) aos dos machos nos restantes meses (tabela 12; tabela G - anexo).

A evolução mensal do peso total dos machos de solha também mostrou uma grande variabilidade dentro de cada mês de estudo, exceto no mês de março de 2017 (figura 21B). A média e a mediana de comprimento variaram entre $236,00 \pm 32,86$ e $419,44 \pm 82,67$ g e 232,00

e 441,21 g, respetivamente, ao longo dos meses de estudo (tabela 12). Neste mês, o peso total dos machos foi significativamente inferior (Kruskal-Wallis $H=10,49$, $p<0,05$) aos machos nos restantes meses de estudo (tabela H - anexo).

Tabela 12 - Intervalos do comprimento total (CT) em centímetros (cm) e do peso total (PT) em gramas (g) com as respetivas médias (Méd), desvios padrões (DP), medianas (Md) e o número de machos presentes (n) no período de estudo. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

Mês	n	CT (cm)			PT (g)		
		Mín – Máx.	Méd ± DP	Md	Mín – Máx	Méd ± DP	Md
nov/16	16	25,40-31,00	31,09±3,34	32,10	170, 14-506,80	341,85±111,52	391,74
dez/16	9	26,40-36,50	31,83±3,14	31,20	203,74-526,64	370,66±103,70	339,87
jan/17	15	28,40-36,40	33,55±2,35	33,50	245,75-528,83	419,14±82,67	441,21
fev/17	5	27,70-34,50	31,50±2,87	31,50	225,79-567,47	379,26±126,14	393,54
mar/17	5	26,00-29,10	27,14±1,21	27,00	195, 00-280,00	236,00±32,86	232,00

O IGS dos machos apresentou uma grande variabilidade de valores, exceto no mês de março (figura 21C). A média e a mediana do IGS variaram entre $0,89\pm0,73$ a $2,71\pm1,04$ e $3,01$ e $0,69$, respetivamente, ao longo dos meses de estudo (tabela 13). Em dezembro, o IGS dos machos foi um significativamente superior (Kruskal-Wallis $H= 25,53$, $p< 0,05$) ao IGS dos machos nos restantes meses de estudo, exceto no mês de janeiro (tabela 13; tabela I - anexo).). O IGS dos machos no mês de janeiro foi significativamente superior (Kruskal-Wallis $H= 25,53$, $p< 0,05$) ao IGS no mês de novembro e março (tabela I - anexo).

O IHS dos machos de solha teve uma grande variabilidade de valores ao longo dos meses de estudo, principalmente no mês de novembro (figura 21D). Nesse mês, o IHS apresentou o maior valor médio e da mediana, em comparação com os restantes meses de estudo (tabela 13), sendo significativamente superior (Kruskal-Wallis $H=9,73$; $p<0,05$) ao IHS dos machos do mês de dezembro e janeiro (tabela J - anexo). A partir do mês de dezembro de 2016, os valores médios e da mediana do IHS dos machos diminuíram e voltam a aumentar no mês de fevereiro e março (figura 21D).

O fator de condição dos machos de solha apresentou uma pequena variabilidade ao longo dos meses de estudo (figura 21E), sem diferenças significativas entre meses (Kruskal-Wallis $H=5,56$; $p>0,05$) (tabela K- anexo). A média e a mediana o K variaram entre $1,09\pm0,07$ a $1,97\pm0,20$ e $1,09$ e $1,18$, respetivamente, ao longo dos meses de estudo (tabela 13).

Tabela 13 - Intervalos do IGS, IHS e K, com as respetivas médias (Méd), desvios padrões (DP) e medianas (Md) dos machos no período da amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; mai/17: maio de 2017.

Mês	IGS			IHS			K		
	Mín – Máx.	Méd ± DP	Md	Mín – Máx.	Méd ± DP	Md	Mín – Máx.	Méd ± DP	Md
nov/16	0,16-2,43	0,89 ±0,73	0,69	0,67-2,25	1,40 ±0,50	1,34	0,94-1,23	1,09 ±0,07	1,09
dez/16	0,55-4,18	2,71 ±1,04	3,01	0,56-1,23	0,88 ±0,24	0,78	1,05-1,30	1,12 ±0,07	1,11
jan/17	1,12-4,10	2,39 ±0,87	2,40	0,73-1,51	0,98 ±0,21	1,00	0,73-4,10	1,97 ±0,20	1,09
fev/17	0,98-2,20	1,46 ±0,53	1,32	0,83-1,43	1,10 ±0,30	0,91	1,01-1,38	1,18 ±0,15	1,21
mar/17	0,63-1,26	1,03 ±0,26	1,16	0,78-1,42	1,14 ±0,26	1,21	1,07-1,25	1,18 ±0,08	1,18

3.2.1. Avaliação macroscópica

Foram encontrados 4 estados de maturação dos testículos de acordo com os parâmetros descritos na tabela 2, nomeadamente: o estado de prematuração (PM) (figura 22A), o estado em maturação (EM) (figura 22B), o estado de maturação tardia (MT) (figura 22C e C1) e o estado de pós-postura ou regressão (POS) (figura 22D)

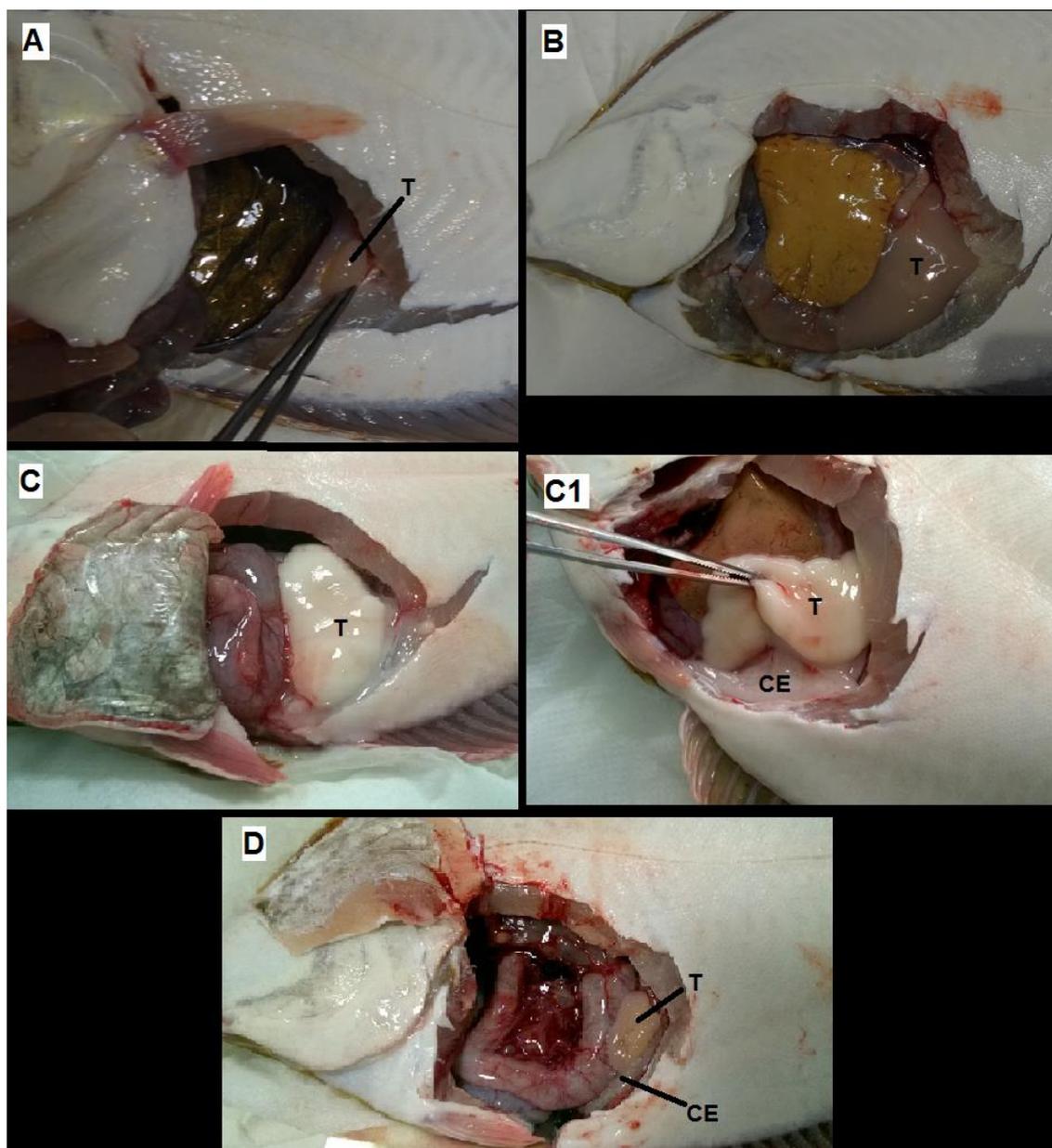


Figura 22 - Classificação macroscópica dos vários estados de maturação dos testículos de *P. flesus* do estuário do rio Douro; A: Estado de prematuração; B: Estado em maturação; C e C1: Estado de maturação; D: Estado de pós-postura ou regressão; CE: Canal eferente; T: Testículo.

Nos meses de estudo, o estado PM foi observado em novembro (n=4), dezembro (n=1) e janeiro (n=1), salientando-se novembro com a maior proporção de machos em estado PM (25%) (figura 23). O estado EM foi também observado em novembro (n=7), dezembro (n=7) e janeiro (n=2), com a maior proporção no mês de dezembro (78%). O estado MT foi observado no mês de dezembro (n=1), janeiro (n=12), fevereiro (n=5) e março (n=5), obtendo a máxima proporção no mês de fevereiro e março (100%). O estado POS só foi detetado no mês de novembro (n=5) (figura 23).

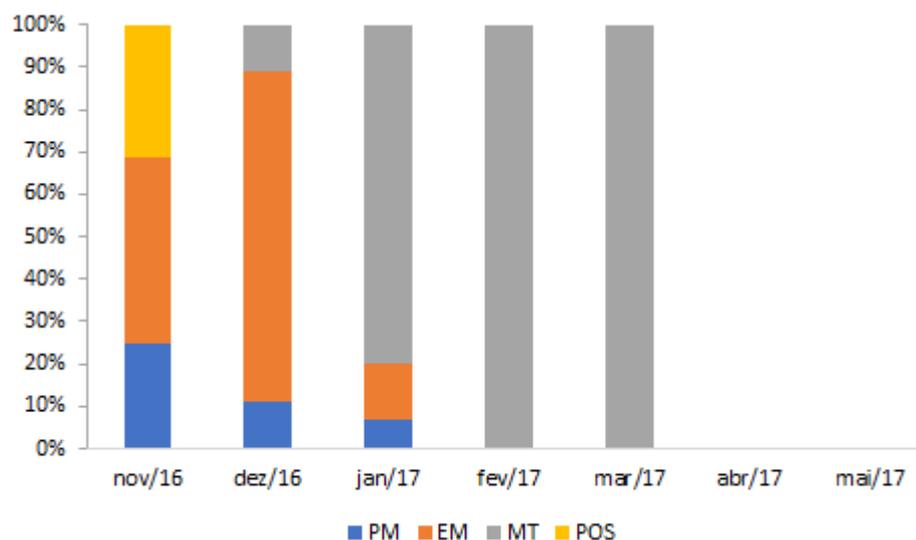


Figura 23 - Proporção de estados de maturação dos testículos de *P. fesus* para cada mês de amostragem por avaliação macroscópica; PM: Estado de prematuração; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação; POS: Estado de pós-postura ou regressão; nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

3.2.2. Avaliação microscópica

Para avaliação microscópica dos estados de maturação do testículo, todos os 50 machos capturados durante o período da amostragem foram avaliados.

3.2.2.1. Descrição do testículo

De uma forma geral, a morfologia dos testículos de *P. fesus* foi semelhante à de outros teleósteos. Cada lobo era formado por vários lóbulos e rodeado por tecido intersticial. As células germinativas foram localizadas na parte interior dos lóbulos e maturavam em grupos dentro dos espermatocistos.

Foram observados quatro estados de células germinativas, nomeadamente:

- as espermatogónias (EPG): células grandes, normalmente acompanhadas por células Sertoli, sendo possível observar o citoplasma e núcleo com os nucléolos (figura 24);
- os espermatócitos (EPC): células mais pequenas do que EPG e ligeiramente basofílicas (figura 24);
- os espermatídeos (EPT): células relativamente mais pequenas e muito mais basofílicas do que os EPC (figura 25B3); e

- os espermatozoides (EPZ): caracterizados por serem as células mais pequenas e extremamente mais basofílicas do que o EPT (figura 26C3).



Figura 24 – Alguns aspetos histológicos das células Sertoli (CS) e de várias células germinativas dos testículos de *P. fesus*; como o citoplasma (c), núcleo (n) com os nucléolos (ncl), espermátogónio (EPG) e o espermátócito (EPC).

Os estados de maturação dos testículos foram avaliados conforme os critérios descritos na tabela 2. Os indivíduos foram divididos em 4 estados de maturação dos testículos, conforme a presença do estado mais avançado das células germinativas nos testículos, nomeadamente: o estado em prematuração (PM) (figura 25A1e A1), o estado em maturação (EM) (figura 25B1 e B2), o estado de maturação (MT) (figura 26C1 e C2) e o estado pós-postura ou regressão (POS) (figura 24, 26D1 e D2).

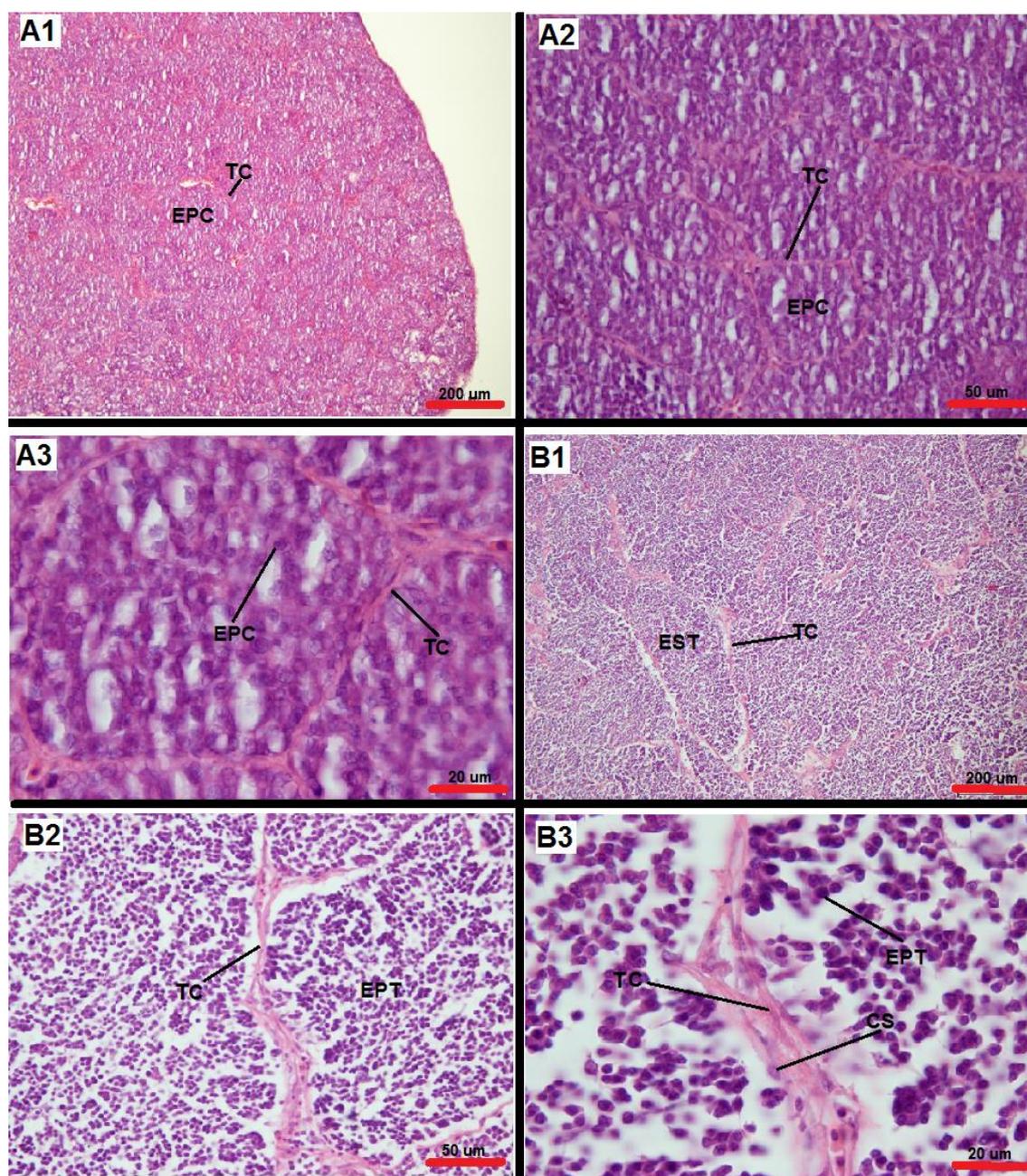


Figura 25 - Avaliação microscópica dos estados de maturação dos testículos de *P. flesus* do estuário do rio Douro. A1: PM (estado de prematuração, 200 µm); A2: PM (estado de prematuração, 50 µm); A3: PM (estado de prematuração, 20 µm); B1: EM (estado em maturação, 200 µm); B2: EM (estado em maturação, 50 µm); B3: EM (estado em maturação, 20 µm); CS: Células Sertoli; EPC: Espermatócitos; EST: Espermatídios; TC: Tecido intersticial.

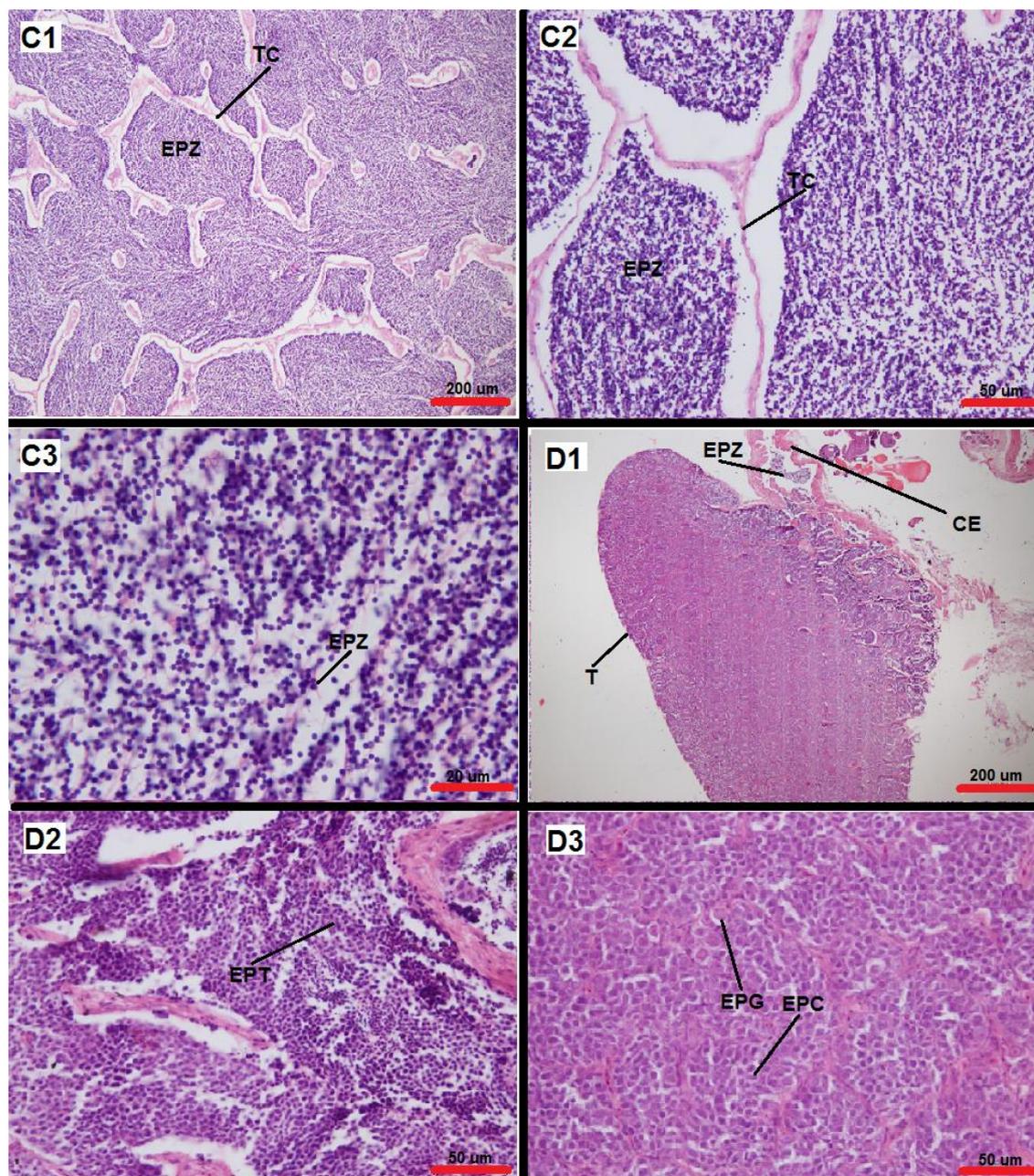


Figura 26 - Continuação da avaliação microscópica dos estados de maturação dos testículos de *P. flesus* do estuário do rio Douro. C1: MT (estado de maturação, 200 μ m); C2: MT (estado de maturação, 50 μ m); C3: MT (estado de maturação, 20 μ m); D1: POS (estado pós-postura ou regressão, 200 μ m); B2: POS (estado pós-postura ou regressão, 50 μ m); B3: POS (estado pós-postura ou regressão, 50 μ m); CE: Canal eferentes; CS: Células Sertoli; EPC: Espermatócitos; EPG: Espermatogónias; EST: Espermatídeos; EPZ: Espermatozoides; TC: Tecido intersticial.

3.2.2.2. Evolução mensal dos estados de maturação do testículo

O estado de PM, caracterizado pela presença de EPC, foi observado em novembro (n=4), dezembro (n=1) e janeiro (n=1), salientando-se novembro com a maior proporção de machos em estado PM (25%) (figura 27). O estado EM, caracterizado pelo EPT, foi também observado em novembro (n=7), dezembro (n=7) e janeiro (n=2), com a maior proporção no mês de

dezembro (78%). O estado MT, caracterizado por EPT, foi observado no mês de dezembro (n=1), janeiro (n=12), fevereiro (n=5) e março (n=5), obtendo a máxima proporção no mês de fevereiro e março (100%). O estado POS, caracterizado por várias células germinativas de espermatogénese, só foi detetado no mês de novembro (n=5) (figura 27).

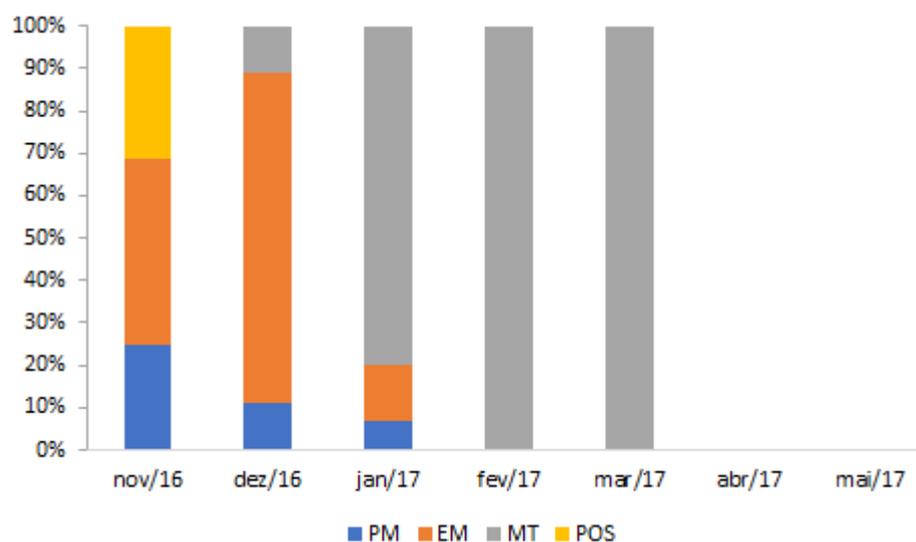


Figura 27 - Proporção dos estados de maturação dos testículos de *P. fesus* para cada mês de amostragem classificados por avaliação microscópica. PM: Estado de prematuração; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação; POS: Estado de pós-postura ou regressão; nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

3.2.2.3. Variação dos índices somáticos com os estados de maturação do testículo

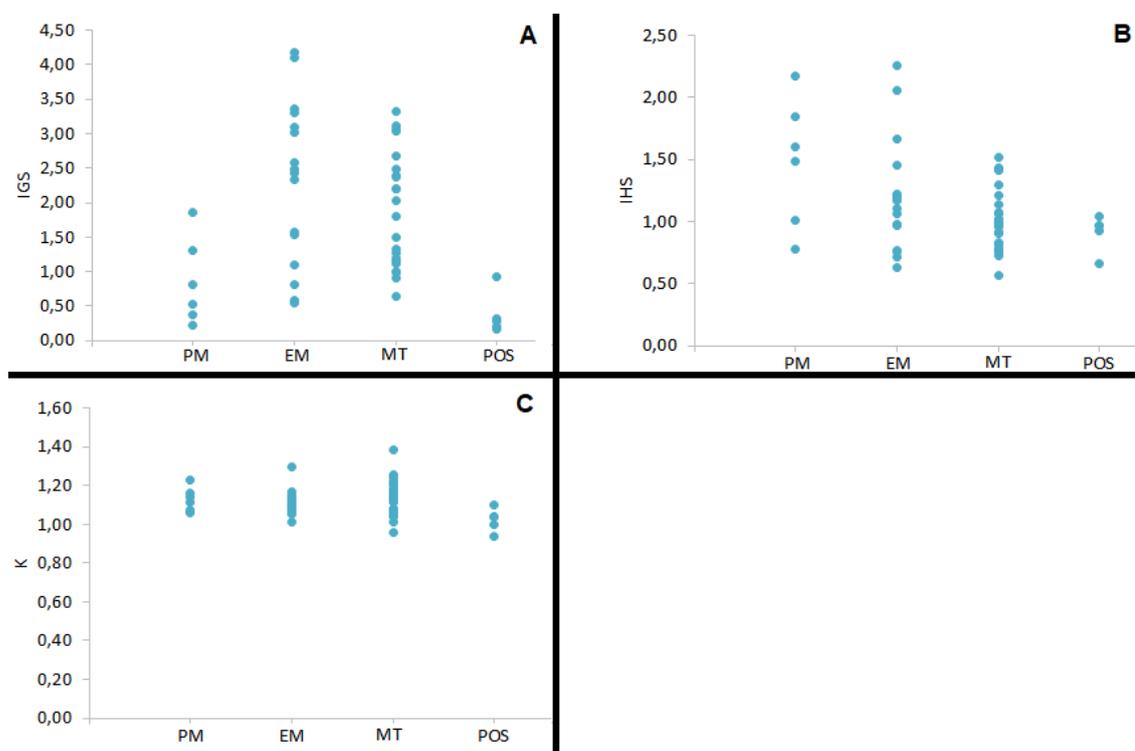


Figura 28 – Distribuição dos vários índices somáticos pelos estados microscópicos de maturação do testículo. IGS: Índice gonodossomático (A); IHS: Índice hepatossomático (B); K: Fator de condição (C); PM: Estado de prematuração; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação; POS: Estado de pós-postura ou regressão.

O IGS dos machos apresentou uma grande variabilidade nos vários estados de maturação do testículo (figura 28A). Este índice teve os maiores valores médios e das medianas no estado EM e no estado MT, em comparação com os restantes estados de maturação (figura 28A, tabela 14). De modo, o IGS dos machos em estado PM e em estado POS foram significativamente inferiores (Kruskal-Wallis, $H=18,63$, $p < 0,05$) ao IGS dos machos em estado EM e em estado MT (tabela Q - anexo).

O IHS dos machos de solha apresentou uma grande variabilidade nos vários estados de maturação do testículo, exceto no estado POS (figura 28B). A média e a mediana do IGS variaram entre $0,91 \pm 0,14$ e $1,48 \pm 0,52$ e $1,54$ e $0,97$, respetivamente, ao longo dos meses de estudo (tabela 13).(tabela 14). O IHS dos machos não apresentou diferenças significativas (Kruskal-Wallis, $H=6,65$, $p > 0,05$) nos diferentes estados de maturação do testículo (tabela R - anexo).

O fator de condição dos machos de solha apresentou baixa variabilidade no estado POS (figura 28C), sendo o menor valor médio e da mediana em comparação com os restantes estados de maturação (tabela 14). Os machos em POS apresentam um fator de condição significativamente inferior (Kruskal-Wallis, $H=9,26$, $p < 0,05$) ao de todos os outros machos (tabela S - anexo).

Tabela 14 – Número de machos e intervalos dos índices somáticos, com as respetivas médias (Méd), desvios padrões (DP) e medianas (Md) dos nos vários estados microscópicos de maturação do testículo. IGS: Índice gonodossomático; IHS: Índice hepatossomático; K: Fator de condição; PM: Estado de prematuração; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação tardia; POS: Estado de pós-postura ou regressão.

	<i>n</i>	IGS			IHS			K		
		<i>Min-Máx</i>	<i>Méd</i> $\pm DP$	<i>Md</i>	<i>Min-Máx</i>	<i>Méd</i> $\pm DP$	<i>Md</i>	<i>Min-Máx</i>	<i>Méd</i> $\pm DP$	<i>Md</i>
<i>PN</i>	6	0,22-1,85	0,85 $\pm 0,62$	0,67	0,78-2,18	1,48 $\pm 0,52$	1,54	1,06-1,23	1,13 $\pm 0,06$	1,13
<i>EM</i>	16	0,55-4,18	2,31 $\pm 1,18$	2,46	0,63-2,25	1,20 $\pm 0,46$	1,13	1,01-1,30	1,11 $\pm 0,01$	1,09
<i>MT</i>	23	0,63-3,33	1,87 $\pm 0,83$	1,80	0,56-1,51	1,02 $\pm 0,26$	0,99	0,96-1,38	1,14 $\pm 0,09$	1,14
<i>POS</i>	5	0,16-0,92	0,38 $\pm 0,31$	0,29	0,67-1,04	0,91 $\pm 0,14$	0,97	0,94-1,10	1,02 $\pm 0,06$	1,04

De acordo com os resultados das correlações de Spearman, apenas a avaliação macroscópica dos estados de maturação dos testículos esteve significativamente e positivamente correlacionada ($r=1,00$; $p < 0,05$) com avaliação microscópica (tabela 15). Todas as restantes correlações significativas apresentam um fator de correlação baixo ($r < 0,05$), não sendo, portanto, consideradas.

Tabela 15 – Fatores de correlação de Spearman entre a avaliação microscópica dos estados de maturação dos testículos e restantes variáveis de estudo.

	<i>Classificação macroscópica</i>
<i>Índice hepatossomático</i>	-0,36*
<i>Índice gonodossomático</i>	-0,15
<i>Fator de condição</i>	-0,14
<i>Classificação microscópica</i>	1,00*

*valor significativo ($p < 0,05$)

Todos os estados de maturação do testículo corresponderam os mesmos estados da classificação macroscópica e microscópica.

3.2.3. 11-Cetotestosterona

No total de 50 machos, apenas não foi possível quantificar a concentração de 11-KT no plasma sanguíneo de 7 machos, pois os níveis de 11-KT estavam abaixo do nível de deteção do kit Elisa.

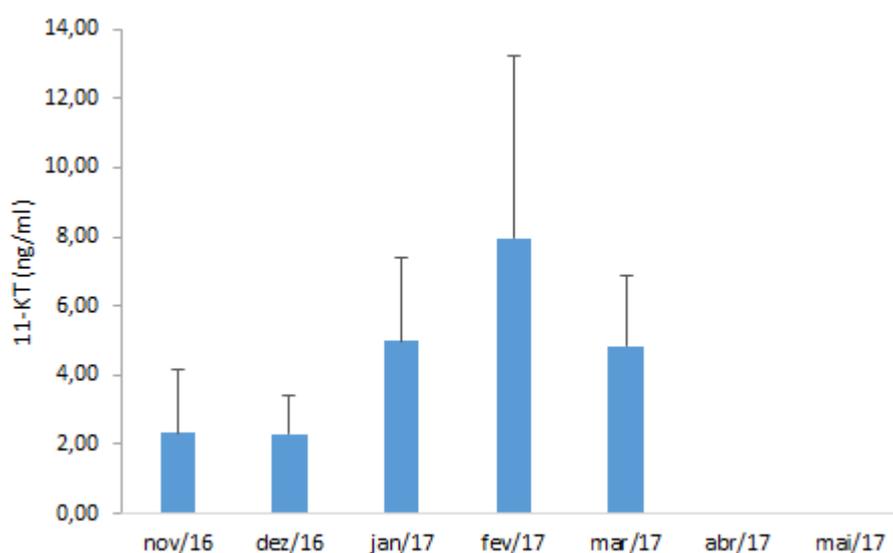


Figura 29 – Evolução do valor médio da concentração do 11-cetotestosterona (11-KT) com os respetivos desvios padrão ao longo dos meses de estudo. nov/16: novembro de 2016 (n=16); dez/16: dezembro de 2016 (n=9); jan/17: janeiro de 2017 (n=13); fev/17: fevereiro de 2017 (n=2); mar/17 março de 2017 (n=3); abr: abril de 2017 (n=0) mai/17: maio de 2017 (n=0).

Ao longo dos meses de estudo, a concentração de 11-KT no plasma sanguíneo dos machos de solha variou entre 0,16 e 4,24 ng/ml (figura 29, tabela 16). O maior valor médio e da mediana da concentração deste esteróide sexual foi detectado no mês de fevereiro de 2017

(7,96±5,26 ng/ml) e os valores médios e das medianas mais baixos foram observados nos meses de novembro (2,34±1,81 ng/ml) e dezembro (2,29±1,14 ng/ml) de 2016 (tabela 16). A concentração de 11-KT no plasma sanguíneo nos meses de novembro e dezembro foram significativamente inferiores (Kruskal-Wallis, H=15,90, p< 0,05) às concentrações de 11-KT dos machos capturados nos restantes meses de estudo (tabela K - anexo).

Tabela 16 – Número de machos e dos intervalos mínimos (Min) e máximos (Máx) do 11-cetotestosterone (11-KT), com as respetivas médias (méd), desvio padrão (DP) e medianas (Md) ao longo dos meses da amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017.

	11-KT (ng/ml)			
	<i>N</i>	<i>Min-Máx</i>	<i>Méd±DP</i>	<i>Med</i>
<i>nov/16</i>	16	0,16-6,21	2,34±1,81	1,98
<i>dez/16</i>	9	0,32-3,98	2,29±1,14	2,34
<i>jan/17</i>	13	1,27-10,55	4,98±2,43	5,29
<i>fev/17</i>	2	4,24-11,68	7,96±5,26	7,96
<i>mar/17</i>	3	2,78-6,79	4,84±2,01	4,95

Nos vários estados de maturação do testículo, a concentração de 11-KT variou entre 0,02 e 11,68 ng/ml (tabela 17). A concentração de 11-KT no plasma sanguíneo dos machos apresentou o maior valor médio e da mediana nos machos em estado MT e o menor valor médio e da mediana nos machos classificados como em estado POS (figura 30 e tabela 17).

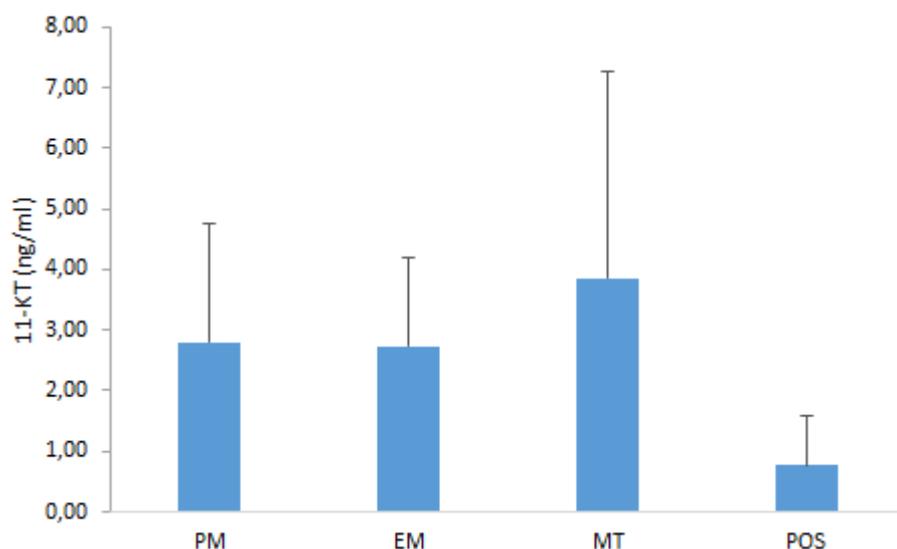


Figura 30 – Evolução do valor médio da concentração de 11-cetotestosterona (11-KT) com os respetivos desvios padrão ao longo dos estados microscópicos de maturação. PM: Estado de prematuração; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação tardia; POS: Estado pós-postura ou regressão.

De facto, os machos em estado MT apresentam concentrações de 11-KT significativamente superiores (Kruskal-Wallis, $H=15,90$, $p < 0,05$) às concentrações de 11-KT do plasma sanguíneo nos restantes estados de maturação (tabela T - anexo). Por outro lado, a concentração de 11-KT dos machos em estado POS foi significativamente inferior (Kruskal-Wallis, $H=15,90$, $p < 0,05$) às concentrações deste esteróide nos restantes estados de maturação do testículo de solha (tabela T - anexo).

Tabela 17 – Número de machos e os intervalos (Min-Máx) do 11-cetotestosterona (11-KT), com as respetivas médias (Méd), desvios padrões (DP) e medianas (Md) nos vários estados microscópicos de maturação do testículo; PM: Estado de prematuração; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação tardia; POS: Estado pós-postura ou regressão.

	<i>n</i>	11-KT (ng/ml)		
		<i>Min-Máx</i>	<i>Méd±DP</i>	<i>Md</i>
PM	6	1,15-6,21	2,80±1,96	2,12
EM	16	0,31-5,48	2,74±1,46	2,57
MT	16	1,32-11,68	5,54±2,65	5,12
POS	5	0,16-2,07	0,78±0,8	0,46

De acordo com os resultados das correlações de Spearman, todas as correlações, apesar de algumas serem significativas, apresentam um fator de correlação baixo ($r < 0,05$), não sendo, portanto, consideradas, exeto o K (tabela 18).

Tabela 18 – Fatores de correlações de Spearman entre 11-cetotestosterona (11-KT) e restantes variáveis nos machos.

	11-KT (ng/ml)
<i>Comprimento total</i>	0,34*
<i>Peso total</i>	0,40*
<i>Índice hepatossomático</i>	0,21
<i>Índice gonodossomático</i>	0,30
<i>Fator de condição</i>	0,53*
<i>Classificação macroscópica</i>	0,11
<i>Classificação microscópica</i>	0,11

*valor significativos ($p < 0,05$)

3.3. Determinação da época de postura

Segundo o método de Iles, pela classificação microscópica, a época de postura das fêmeas de solha no estuário do rio Douro começou no mês de janeiro, quando 60% das fêmeas se encontrava no estado de pré-postura. Por outro lado, não foi possível determinar o fim da época de postura, uma vez que no último mês de estudo (maio) ainda não havia mais de 50% de fêmeas no estado de pós-postura. Nos machos, a época de postura começou também em janeiro, altura em que 80% dos machos estava em estado MT (estado de postura) (tabela 19). Tal como nas fêmeas, também não foi possível determinar o fim da época de postura, uma vez que em março, o último mês em que foram capturados machos no estuário do rio Douro, nenhum macho se encontrava no estado pós-postura.

Tabela 19 – Evolução mensal da proporção do número de fêmeas e de machos no estado de pré-postura ou postura e pós-postura, através da classificação microscópica dos estados de maturação das gónadas. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

	Fêmeas		Machos	
	<i>Pré-postura</i>	<i>Pós-postura</i>	<i>Postura</i>	<i>Pós-postura</i>
<i>nov/16</i>	0%	0%	0%	31%
<i>dez/16</i>	0%	0%	11%	0%
<i>jan/17</i>	60%	0%	80%	0%
<i>fev/17</i>	69%	8%	100%	0%
<i>mar/17</i>	22%	33%	100%	0%
<i>abr/17</i>	60%	20%	-	.
<i>mai/17</i>	50%	25%	-	-

Através da classificação macroscópica, a época de postura das fêmeas de solha no estuário do rio Douro começou no mês de dezembro e acabou no mês de abril, quando mais de 50% das fêmeas se encontrava no estado de pós-postura (tabela 20). No caso dos machos, a época de postura começou no mês de janeiro e não foi possível determinar o fim da época, uma vez que em nenhum dos meses de estudo houve mais de 50% de machos em estado de pós-postura (tabela 20).

Tabela 20 – Evolução mensal da proporção do número de fêmeas e de machos no estado de pré-postura ou postura e pós-postura, através da classificação macroscópica dos estados de maturação das gónadas. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

	Fêmeas		Machos	
	<i>Pré-postura</i>	<i>Pós-postura</i>	<i>Postura</i>	<i>Pós-postura</i>
<i>nov/16</i>	0%	0%	0%	31%
<i>dez/16</i>	75%	0%	11%	0%
<i>jan/17</i>	93%	0%	80%	0%
<i>fev/17</i>	96%	2%	100%	0%
<i>mar/17</i>	58%	27%	100%	0%
<i>abr/17</i>	27%	68%	-	.
<i>mai/17</i>	20%	77%	-	-

Nas fêmeas, foi possível determinar o início da época de postura utilizando valores de IGS do E₂ como indicadores do estado de maturação. Assim, o estado de pré-postura foi determinado com base no valor médio de cada parâmetro no estado VITT (14,97 para o IGS e 51,22 ng/ml

para o E₂), tendo-se calculado a proporção de fêmeas com o IGS≥14,97 e E₂≥51,22 ng/ml para cada mês de estudo (tabela 20). No entanto, não foi possível determinar o fim da época, porque o valor médio destes índices no estado pós-postura (indicativos do fim da época) não foram significativamente diferentes em relação aos outros estados de maturação do ovário, pelo que não foi, por isso, considerado como distintivo do estado de pós-postura. Os resultados mostraram que não foi possível determinar o início da época de postura com base no IGS, porque em nenhum mês de estudo foram observadas mais de 50% da população com valores de IGS≥14,97. Em relação ao E₂, a época de postura começou no mês de maio, altura em que foram observadas 50% de fêmeas com concentração de E₂≥51,22 ng/ml (tabela 21).

Tabela 21 - Evolução mensal da proporção do número de fêmeas (n) com o IGS IGS≥14,97 e do E₂≥51,52 ng/ml em cada mês de estudo, no estado pré-postura. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

	n	Pré-postura		
		IGS≥14,97	n	E ₂ ≥51,52 ng/ml
nov/16	12	0%	6	0%
dez/16	20	0%	9	0%
jan/17	45	4%	10	10%
fev/17	55	38%	12	17%
mar/17	33	9%	8	25%
abr/17	22	0%	5	20%
mai/17	30	10%	4	50%

Para os machos, só foi possível determinar a época de postura através da concentração de esteroides sexuais, pois o IGS dos machos em estado MT ou em estado POS de maturação não foi significativamente diferente (Kruskal-Wallis, H=18,63, p< 0,05) do IGS dos machos nos restantes estados de maturação do testículo (ver página 57). Por outro lado, a concentração de 11-KT no estado MT (5,21 ng/ml) e no estado POS do testículo (0,78 ng/ml) foi significativamente diferente em relação aos outros estados de maturação do testículo. Assim, todos os machos com 11-KT≥5,21 ng/ml foram classificados em estado de postura e os machos com 11-KT≤0,78 ng/ml foram classificados como em pós-postura. Deste modo, o início da época de postura começou no mês de janeiro (54%), quando mais de 50% dos machos apresentavam concentração de 11-KT≥5,21 ng/ml (tabela 22). E não foi detetado o fim da época de postura, pois não se encontrou mais do que 50% dos machos com concentração de 11-KT≤0,78 ng/ml.

Tabela 22 - Evolução mensal da proporção do número de machos (n) com 11-KT \geq 5,21 ng/ml e \leq 0,78 ng/ml em cada mês de estudo, no estado de postura e pós-postura. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017.

		Postura	Pós-postura
		11-KT \geq 5,21 ng/ml	11-KT \leq 0,78 ng/ml
<i>nov/16</i>	16	6%	25%
<i>dez/16</i>	9	0%	0%
<i>jan/17</i>	13	54%	0%
<i>fev/17</i>	2	50%	0%
<i>mar/17</i>	3	30%	0%

***Capítulo IV* - Discussão**

4.1. Época de postura

Neste estudo, a época de postura de *P. flesus* do estuário do rio Douro começou no mês de janeiro e prolongou-se até ao final dos meses de estudo, em ambos os géneros. Apesar da época de postura nos machos ter começado no mesmo mês das fêmeas (janeiro), as análises histológicas mostraram que os machos de solha começaram a maturar um mês mais cedo do que as fêmeas. E, tendo em consideração que para a determinação da época de postura se consideraram os machos em estado de postura (maturação) enquanto que para as fêmeas foi considerado o estado de pré-postura (vitelogénico tardio), a antecipação da maturação dos machos torna-se ainda mais evidente. Este desfasamento na maturação das gónadas entre machos e fêmeas parece indicar que os machos, depois de maturarem, armazenam os espermatozoides no canal eferente até às fêmeas estarem prontas para desovarem. Segundo alguns autores (Beaumariage, 1973; Summers, 1979) este desfasamento deve-se ao facto da espermatogénese ser ligeiramente mais rápida do que a oogénese. Noutras espécies de peixes planos, como é o caso de *Limanda limanda*, os espermatozoides podem permanecer um ou dois meses no canal eferente (Htun-Han, 1978c) e, no caso da *Pleuronectes americanus*, até um período máximo de seis meses (Harmin et al., 1995), até ao ato da postura.

Existem evidências que os machos começam a migração reprodutiva mais cedo que as fêmeas para as zonas de postura (Gibson, 1997). Efetivamente, Janssen et al. (1995) mostraram que as fêmeas de *P. flesus* passavam grande parte do seu ciclo reprodutivo no Mar de Wadden e migravam para o Mar do Norte antes de atingirem o estado de maturação do ovário. Pelo contrário, os machos só iniciavam a sua migração para o Mar do Norte, depois de atingirem o estado de maturação do testículo (Monteiro, 2000). Isto indica que o ciclo reprodutivo desta espécie é ligeiramente diferente entre os géneros sexuais. Os resultados do presente estudo suportam esta hipótese de as fêmeas deixarem o estuário em direção às zonas de postura antes de atingirem o estado de maturação do ovário, ao contrário dos machos que iniciam a sua migração para as zonas de postura já em estado de maturação do testículo. Estes resultados também sugerem que a postura desta espécie ocorre fora do estuário do rio Douro, contrariamente à hipótese levantada por Morais et al., (2011) para o estuário do rio Minho. Além disso, neste estudo foram detetadas fêmeas em pós-postura (folículos da pós-desova) dentro do estuário do rio Douro e durante vários meses da época de postura (fevereiro a abril) e, não foram detetados machos em pós-postura em nenhum desses meses. Isto leva a supor que os machos permanecem durante algum tempo nas zonas de postura, ao contrário das fêmeas que parecem regressar logo ao estuário após a postura.

Apesar de se terem detetado várias fêmeas em pós-postura em vários meses (fevereiro a maio) da época de postura, não foi possível determinar o fim da época de postura segundo o método de Iles baseado na classificação microscópica das gónadas, por exemplo: em nenhum dos meses de estudo foi detetado mais de 50% das fêmeas em pós-postura (com presença de folículos de pós-desova nos ovários). Isto pode ter sido devido ao número de fêmeas analisadas histologicamente (57 fêmeas), que foi mais reduzido do que as fêmeas classificadas macroscopicamente (267 fêmeas). Segundo a classificação macroscópica das gónadas, a época de postura terminou em abril, quando a maioria das fêmeas foi classificada como estando em pós-postura.

Noutros locais, o início da época de postura descrita para *P. flesus* coincide com a época de postura neste estudo (janeiro). Por exemplo, no litoral de Aveiro, a época de postura ocorre entre janeiro e março (Sobral, 2007). No estudo de Monteiro (2000) (com o principal objetivo de estudar a evolução das hormonas esteroides sexuais nos machos e nas fêmeas), a época de postura de *P. flesus* foi de janeiro a abril no estuário do rio Douro, com a presença de fêmeas em estado de pré-postura (ovários com oócitos vitelogénicos tardios) a partir de novembro até abril; e com as fêmeas em estado de pós-postura (presença de folículos de pós-desova) de fevereiro a maio. No Mar do Norte foram detetados ovos desta espécie entre o mês de janeiro e abril (Van der Land, 1991). De uma forma geral, o período de postura da espécie não parece exceder os 3 meses, tal como para *Pleuronectes platessa* (Ellis and Nash, 1997; Daan et al., 1985; Pommerantz et al., 1981; Daniel and Fleming, 1993).

No estudo de Sobral (2007), o estado de pós-postura dos machos de *P. flesus* ocorreu entre agosto e outubro e foi caracterizado microscopicamente pela presença de espermatozoides residuais e de espermatogónias no testículo. Neste trabalho, o estado pós-postura dos testículos de *P. flesus* foi caracterizado pela presença de espermatozoides residuais, com várias células germinativas da espermatogénese (espermatogónias, espermatócitos e espermatídeos) e foi detetado apenas no mês de novembro. A presença de várias células germinativas no testículo numa espécie sazonal (Mañanós et al., 2008), como é o caso da *P. flesus* (Janssen et al., 1995) e *Hippoglossus hippoglossus* (Murua and Saborido-Rey, 2003) não é comum. No entanto, esta situação foi também observada por Monteiro (2000) no Mar de Wadden. Neste estudo, os testículos de *P. flesus*, com as várias células germinativas do testículo foram caracterizados como um possível estado de pós-postura, tal como no estudo de Weltzien et al., (2002) em *Hippoglossus hippoglossus*.

Neste estudo, a classificação macroscópica dos estados de maturação das gónadas mostrou ser um bom indicador para determinar a época de postura de *P. flesus*. A elevada concordância entre os estados de maturação determinados macroscopicamente e microscopicamente pode ter sido consequência do pequeno número de estados utilizados para determinar a maturação das gónadas (Gerritsen and McGrath, 2006). No entanto, segundo o método de Iles baseado na avaliação macroscópica, o início da época de postura das fêmeas começou mais cedo (dezembro) em comparação com a classificação microscópica (janeiro), uma vez que os ovários entre estes meses não apresentaram diferenças morfológicas evidentes do ponto de vista macroscópico. Dos índices somáticos estudados, apenas o IGS das fêmeas apresentou um padrão concordante com a época de postura pela classificação macroscópica, aumentando a partir do mês de janeiro e apresentando o menor valor no mês de abril, quando terminou a época de postura. Estes resultados parecem indicar que o IGS constitui um bom indicador para determinação do início da época de postura, mas não foi o mais evidente da época exata de postura. Pela análise histológica, verificou-se que apesar do IGS aumentar a partir no mês de dezembro, nessa altura não foram detetadas fêmeas com o estado vitelogénico tardio, segundo a classificação microscópica.

Neste trabalho testou-se a utilização de outros parâmetros para além do estudo histológico das gónadas como indicadores da época de postura. Nas fêmeas, testou-se o IGS e a concentração de E_2 no estado de pré-postura (vitelogénico tardio); e nos machos a concentração de 11-KT no estado de postura e no estado de pós-postura. O IGS nos machos não foi utilizado para determinar a época de postura, porque este índice somático não aumentou com a concentração de 11-KT ao longo dos estados de maturação (a nível histológico) do testículo, tal como observado no estudo de Harmin et al. (1995) em *Pleuronectes americanus*. Contrariamente, nas fêmeas, o IGS aumentou com a concentração de E_2 , o que está de acordo com outros estudos (Harmin et al., 1995; Sol et al., 1998; Ribeiro, 2002). Contudo para as fêmeas, nem o IGS nem a concentração de E_2 no estado pré-postura (vitelogénese tardia) foram considerados como bons indicadores para determinar a época de postura, porque a época de postura determinada por estes parâmetros não coincidiu com a época determinada microscopicamente. No caso dos machos a concentração de 11-KT no estado de postura (maturação) foi um bom indicador para determinar o início da época de postura, porque a proporção de machos com a concentração deste esteroide sexual no estado de postura (maturação) foi superior a 50% no mês de janeiro. A elevada variabilidade na concentração de E_2 (0,32 a 127,49 ng/ml) detetada em fêmeas classificadas como em estado pré-postura (vitelogénico tardio) pode explicar porque este parâmetro não foi um bom indicador do início da época de postura. De facto, esta variação da concentração de 11-KT no

estado de postura (maturação) (1,32 a 11,68 ng/ml) foi mais pequena nos machos do que a observada para as fêmeas. Futuramente, a concentração de 11-KT no estado de postura (maturação) poderão ser um bom indicador não invasivo para determinar a época de postura, uma vez que ao contrário dos outros parâmetros analisados neste estudo, não requerem o sacrifício do animal.

4.2. Maturação das gónadas

A maturação das gónadas de *P. flesus* em ambos os géneros sexuais foi semelhante a outras espécies de peixes planos, tal como: *Pleuronectes platessa* (Doran, 2011), *Limanda limanda* (Htun-Han, 1978b), *Solea solea* (Ramsay and Witthames, 1996; Ribeiro, 2002) e *Hippoglossus hippoglossus* (Weltzien et al., 2002). A nível macroscópico, esta espécie apresentou características morfológicas (cor, tamanho e volume) muito semelhantes a *P. platessa*, no entanto não apresentou o mesmo número de estados de maturação do ovário segundo as duas classificações utilizadas (macro e microscópica).

Ao contrário de outros estudos (Htun-Han, 1978bc; Weltzien et al., 2002; Doran, 2011), o estado imaturo ou virgem das gónadas não foi considerado neste estudo, uma vez que só foram analisadas solhas adultas.

A nível macroscópico, os ovários das fêmeas de *P. flesus* neste estudo foram classificados em 5 estados de maturação diferentes, enquanto que a nível histológico foram descritos 6 estados de maturação do ovário. No estudo de Doran, (2011) com fêmeas de *P. platessa*, os ovários foram classificados macroscopicamente em 6 estados de maturação (sem contar com o estado imaturo ou virgem), assim como a classificação microscópica, com 6 estados de maturação do ovário. A nível macroscópico não foi possível neste estudo discriminar ovários com oócitos vitelogénicos dos ovários com oócitos vitelogénicos tardios, sendo que foram considerados como equivalentes, uma vez que não apresentavam evidências morfológicas claras (cor, tamanho e volume do ovário) que os permitisse diferenciar, tal como no estudo de Htun-Han, (1978b) com fêmeas de *Limanda limanda*. A nível macroscópico, o estado pós-desova nos ovários de *P. platessa* foi confundido com o estado de imaturo ou virgem da classificação microscópica (Doran, 2011). O facto deste estudo não ter analisado juvenis, evitou este tipo de confusão entre estados imaturo e pós-desova, estado este que foi coincidente em ambas classificações (macro e microscopicamente) utilizadas.

Os testículos de *P. flesus* foram classificados em 4 estados de maturação do testículo, em ambas as classificações utilizadas. Num estudo em *P. platessa*, os testículos foram classificados em 5 estados de maturação (sem contar com o estado imaturo ou virgem) em ambas as classificações (macro e microscópica) (Doran, 2011), em que o estado de pré-postura foi classificado quando o testículo apresentava espermatozoides revestidos por uma camada de tecido conjuntivo e o estado de postura (maturação) com espermatozoides desorganizada no testículo. Neste estudo, o estado de maturação do testículo (estado de postura) foi caracterizado a nível histológico unicamente pela presença de espermatozoides, o que pode justificar o facto de não ter havido diferenças entre a classificação macro e microscópica do estado de maturação (estado de postura) do testículo de *P. flesus*. Existem evidências que quanto menor for o número de estados de maturação das gónadas, menor é o risco de se incorrer em erros na classificação dos estados das gónadas a nível macroscópico (Gerritsen and McGrath, 2006), tal como se verificou neste estudo.

4.3. Índices somáticos

O índice gonodossomático (IGS) das fêmeas de *P. flesus* no estuário do rio Douro aumentou com o início da época de postura desta espécie, atingindo o maior valor médio no mês de fevereiro, quando grande parte das fêmeas se encontrava no estado vitelogénico tardio do ovário. A partir do mês de março, o IGS nas fêmeas começou a diminuir, com o aparecimento das fêmeas em pós-postura. Em estudos semelhantes, como é o caso do estudo de Janssen et al. (1995) e Monteiro (2000), o IGS das fêmeas de *P. flesus* também aumentou nos meses em que as fêmeas apresentaram ovários com oócitos vitelogénicos tardios e, diminuiu nos meses em que os ovários apresentavam os folículos da pós-desova. O acentuado aumento do IGS nos ovários desta espécie, assim como noutras espécies de teleosteos (Tyler and Sumpter, 1996), está relacionado com a elevada acumulação dos grânulos de vitelo dentro do oócito e, a diminuição do IGS está associada à expulsão dos oócitos maduros no ato da postura (Tyler and Sumpter, 1996). No caso dos machos, o IGS diminuiu com o início da época de postura, quando grande parte dos machos se encontrava no estado de maturação do testículo (testículos com espermatozoides), tal como no estudo de Monteiro (2000) com machos de *P. flesus* do Mar de Wadden. Este fenómeno também foi observado em *Pleuronectes americanus*, em que se detetou um decréscimo do IGS coincidente com um aumento dos espermatozoides nos testículos (Harmin et al., 1995). O facto do IGS diminuir com a presença de espermatozoides nos testículos, é explicado pelo facto destas células germinativas não terem citoplasma celular e apresentarem um núcleo bastante condensado

em comparação com os espermátides (Scott et al., 1980), diminuindo assim o peso do testículo.

Neste estudo, o índice hepatossomático (IHS) e o fator de condição (K) nas fêmeas de *P. flesus* aumentou e também diminuiu após o início da época de postura. No caso dos machos de *P. flesus*, com o início da época de postura, o IHS aumentou e o K diminuiu. No estudo de Htun-Han (1978a), o IHS e o K nas fêmeas de *Limanda limanda* diminuiu com o início da época de postura, enquanto que o IHS e o K nos machos aumentaram e diminuíram com a época de postura. O facto do IHS nas fêmeas aumentar com o início da época de postura, pode estar associado à formação dos grânulos de vitelo no fígado (Htun-Han, 1978; Lee, 1972). No entanto, os resultados mostraram que ambos os índices não apresentaram padrões claros de variação ao longo da maturação das gónadas, não sendo assim possível perceber de que forma a condição geral dos indivíduos (K) e o fígado (IHS) foram afetados com o início da época de postura.

4.4. Esteroides sexuais

As fêmeas de *P. flesus* apresentaram as concentrações mais altas de 17β -estradiol (E_2) no estado de pré-postura (vitelogénico tardio), assim como no estudo de Monteiro (2000). De facto, a concentração de E_2 aumentou com o início da época de postura, assim como noutras espécies de peixes planos (ex.: *Pleuronectes americanus* (Harmin et al., 1995) e *Pleuronectes vetulus* (Sol et al., 1998)). O facto da concentração de E_2 aumentar com a maturação dos ovários está relacionada com a ativação do sistema hipotálamo-hipófise-ovário durante a oogénese, principalmente na fase da vitelogénese (Urbatzka et al., 2011).

O 11-cetotestosterona (11-KT) é o esteroide sexual mais abundante na espermatogénese e a sua concentração aumentou gradualmente com a maturação do testículo, após adquirir o estado de maturação, devido à ativação do sistema hipotálamo-hipófise-testículo (Knapp and Carlsile, 2011). Neste estudo, a concentração de 11-KT aumentou com a maturação do testículo (exceto no estado de pós-postura), registando-se o valor mais alto no estado de postura (maturação do testículo), tal como observado noutros trabalhos (Monteiro, 2000). Por outro lado, a concentração de 11-KT também aumentou com o início da época de postura.

***Capítulo V* - Conclusão**

O presente estudo mostrou que, segundo a classificação microscópica dos estados de maturação das gónadas, a época de postura de *P. flesus* do estuário do rio Douro começou no mês de janeiro para ambos os géneros sexuais. Através da classificação macroscópica, a época de postura ocorreu entre os meses de dezembro a abril nas fêmeas de *P. flesus* e nos machos a época de postura começou no mês de janeiro. Dentro do estuário do rio Douro, não foram detetadas fêmeas em estado de maturação do ovário (postura) e os machos desapareceram depois de atingirem o estado de maturação do testículo (postura). O IGS parece constituir um bom indicador da maturação dos ovários, mas não para a maturação dos testículos. A concentração da 11-KT aumentou com o início da época de postura (janeiro), salientando a potencial utilização deste parâmetro não invasivo para a determinação do início da época de postura de *P. flesus*.

Neste estudo ficaram algumas questões por validar sobre o ciclo reprodutivo desta espécie, nomeadamente:

- Período de armazenamento de espermatozoides nos canais condutores de esperma até ao ato da postura;
- Se as fêmeas estão presentes unicamente nas zonas adjacentes no estuário quando o ovário atinge o estado de maturação e se realmente maturam fora do estuário;
- Se nas zonas adjacentes ao estuário os machos se encontram unicamente com o estado de maturação do testículo; e
- Determinar o fim do período da época de postura pela classificação microscópica dos estados de maturação das gónadas.

A identificação exata dos locais para a reprodução desta espécie migratória, assim como noutras espécies migratórias é importante para a conservação da natureza, para gestão sustentável das pescas e o ordenamento dos espaços marinhos (Orio et al., 2017).

Capítulos VI – Referências bibliográfica

- Armstrong, M., Connolly, P., Nash, R., Pawson, M., Alesworth, E., Coulahan, P., Dickey-Collas, M., Milligan, S., O'Neill, M., Witthames, P., 2001. An application of the annual egg production method to estimate the spawning biomass of cod (*Gadus morhua* L.), plaice (*Pleuronectes platessa* L.) and sole (*Solea solea* L.) in the Irish Sea. *ICES Journal of Marine Science* 58, 183-203.
- Avise, J., Mank, J., 2009. Evolutionary perspectives on hermaphroditism in fishes. *Sexual Development* 3, 152-163.
- Babin, P.J., Carnevali, O., Lubzens, E., Schneider, W.J., 2007. Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish, *The Fish Oocyte*, Springer, pp. 39-76.
- Barr, W., 1963. The endocrine control of the sexual cycle in the plaice, *Pleuronectes platessa* (L). III. The endocrine control of spermatogenesis. *General and comparative endocrinology* 3, 216-225.
- Beaumariage, D.S., 1973. Age, growth, and reproduction of king mackerel, *Scomberomorus cavalla*, in Florida. Florida Department of Nature Resources. 100Eighth Avenue SE, EUA.
- Billard, R., 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction Nutrition Développement* 26, 877-920.
- Billard, R., Fostier, A., Weil, C., Breton, B., 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39, 65-79.
- Blazer, V., 2002. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 85-101.
- Bromley, P., 2000. Growth, sexual maturation and spawning in central North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.), and the generation of maturity ogives from commercial catch data. *Journal of Sea Research* 44, 27-43.
- Brown-Peterson, N.J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B.J., Lowerre-Barbieri, S.K., 2011. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries* 3, 52-70.
- Buckley, L., Smigielski, A., Halavik, T., Caldarone, E.M., Burns, B., Laurence, G., 1991. Winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* reproductive success. II. Effects of spawning time and female size on size, composition and viability of eggs and larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 125-135.
- Cabral, H.N., Vasconcelos, R., Vinagre, C., França, S., Fonseca, V., Maia, A., Reis-Santos, P., Lopes, M., Ruano, M., Campos, J., 2007. Relative importance of estuarine flatfish nurseries along the Portuguese coast. *Journal of Sea Research* 57, 209-217.
- Craig, S.R., MacKenzie, D.S., Jones, G., Gatlin, D.M., 2000. Seasonal changes in the reproductive condition and body composition of free-ranging red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 190, 89-102.

- Daan, N., Rijnsdorp, A., Van Overbeeke, G., 1985. Predation by North Sea herring *Clupea harengus* on eggs of plaice *Pleuronectes platessa* and cod *Gadus morhua*. Transactions of the American Fisheries Society 114, 499-506.
- Damasceno-Oliveira, A., Fernández-Durán, B., Gonçalves, J., Couto, E., Canario, A.V., Coimbra, J., 2012. Plasma steroid hormone levels in female flounder *Platichthys flesus* and the influence of fluctuating hydrostatic pressure. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 163, 272-277.
- Daniel, R., Fleming, R., 1933. Plaice-marking experiments in the Irish Sea, 1929-1931, Proceedings and Transactions of the Liverpool Biological Society, pp. 17-70.
- Daverat, F., Morais, P., Dias, E., Babaluk, J., Martin, J., Eon, M., Fablet, R., Pécheyran, C., Antunes, C., 2012. Plasticity of European flounder life history patterns discloses alternatives to catadromy. Marine Ecology Progress Series 465, 267-280.
- Deniel, C., 1984. Relation entre l'activité reproductrice et la croissance chez les poissons plats de la baie de Douarnenez.
- Diretiva 2010/63/EU do concelho de Setembro. Jornal oficial da União Europeia, Parlamento Europeia.
- Doran, L.M., 2011. Age, growth and reproductive biology of Plaice, (*Pleuronectes platessa* L.) in Irish waters, 2003-2005.
- Ellis, T., Nash, R.D., 1997. Spawning of plaice *Pleuronectes platessa* L. around the Isle of Man, Irish Sea. ICES Journal of Marine Science 54, 84-92.
- FAO, (2017). Species Fact Sheets *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758). Fisheries and Aquaculture Department (FAO). <http://www.fao.org/fishery/species/2550/en> (consultado em 8 de Julho de 2016).
- Ferreira, M., Antunes, P., Gil, O., Vale, C., Reis-Henriques, M., 2004. Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. Aquatic toxicology 69, 347-357.
- Freitas, V., Kooijman, S.A., van der Veer, H.W., 2012. Latitudinal trends in habitat quality of shallow-water flatfish nurseries. Marine Ecology Progress Series 471, 203-214.
- Froese, R., Frieß, C., 1992. Synopsis of biological data on *Platichthys flesus* (L.), ICES assessment units 22 and 24, using the FISHBASE format. ICES CM.
- Gerritsen, H., McGrath, D., 2006. Variability in the assignment of maturity stages of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) and whiting (*Merlangius merlangus* L.) using macroscopic maturity criteria. Fisheries Research 77, 72-77.
- Gibson, R., 1997. Behaviour and the distribution of flatfishes. Journal of Sea Research 37, 241-256.

- Gonçalves, D.M., Oliveira, R.F., 2010. Hormones and sexual behavior of teleost fishes. *Hormones and reproduction of vertebrates*, 119-147.
- Grier, H.J., 1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *American Zoologist* 21, 345-357.
- Guerrero, G., 2007. Seasonal steroids variations and maturity stages in the female chub, *Leuciscus cephalus L.* (Pisces, Cyprinidae). *Italian Journal of Zoology* 74, 317-324.
- Hall, P.F., 1984. Cellular organization for steroidogenesis. *International review of cytology* 86, 53-95.
- Harmin, S., Crim, L., Wiegand, M., 1995. Plasma sex steroid profiles and the seasonal reproductive cycle in male and female winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Marine Biology* 121, 601-610.
- Harvey, B., Carolsfeld, J., 1993. Induced breeding in tropical fish culture. *International Development Research Centre Ottawa*.
- Herrera, M., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., la Roca, E., Mancera, J.M., 2015. Metabolic enzyme activities in relation to crowding stress in the wedge sole (*Dicologlossa cuneata*). *Aquaculture research* 46, 2808-2818.
- Htun-Han, M., 1978a. The reproductive biology of the dab *Limanda limanda (L.)* in the North Sea: gonosomatic index, hepatosomatic index and condition factor. *Journal of Fish Biology* 13, 369-378.
- Htun-Han, M., 1978b. The reproductive biology of the dab *Limanda limanda (L.)* in the North Sea: seasonal changes in the ovary. *Journal of Fish Biology* 13, 351-359.
- Htun-Han, M., 1978c. The reproductive biology of the dab *Limanda limanda (L.)* in the North Sea: seasonal changes in the testis. *Journal of Fish Biology* 13, 361-367.
- Iles, T. D. 1964. The duration of maturation stages in herring. *Journal du Conseil permanent International pour l'Exploration de la mer*, 29:166-188.
- Janssen, P., Lambert, J., Goos, H., 1995. The annual ovarian cycle and the influence of pollution on vitellogenesis in the flounder, *Pleuronectes flesus*. *Journal of Fish Biology* 47, 509-523.
- Jerez, S., Rodriguez, C., Cejas, J., Bolanos, A., Lorenzo, A., 2006. Lipid dynamics and plasma level changes of 17 β -estradiol and testosterone during the spawning season of gilthead seabream (*Sparus aurata*) females of different ages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 143, 180-189.
- Kagawa, H., 2013. Oogenesis in teleost fish. *Aqua-BioScience Monographs* 6, 99-127.
- Knapp, R., Carlisle, S., 2011. Testicular function and hormonal regulation in fishes. *Hormones and Reproduction of Vertebrates* 1, 43-63.

- Kosior, M., Grygiel, W., Kuszczynski, J., 1996. Changes in the absolute fecundity of the southern Baltic flounder, *Platichthys flesus* (L.). Bulletin of the Sea Fisheries Institute 2, 15-27.
- Kosior, M., Kuszczynski, J., Grygiel, W., 1996. Reproduction of Baltic flounder (*Platichthys flesus* (L.)) in relation to some somatic factors. ICES CM.
- Le Menn, F., Cerdà, J., Babin, P.J., 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles, The Fish Oocyte, Springer, pp. 1-37.
- Lee Larson, G., 1973. Liver weight of brook trout in a high-mountain lake in Washington state. The Progressive Fish-Culturist 35, 234-236.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. General and comparative endocrinology 165, 367-389.
- Madureira, T.V., Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Rodrigues, I., Monteiro, R.A., Rocha, E., 2012. The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): evaluation of impacts on fish liver, by histopathology, stereology, vitellogenin and CYP1A immunohistochemistry, after sub-acute exposures of the zebrafish model. Environmental toxicology and pharmacology 34, 34-45.
- Mañanós, E., Duncan, N., Mylonas, C., 2008. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, 3-80.
- Manning, A., Burton, M., Crim, L., 2004. Puberty and recrudescence in cultured male yellowtail flounder: plasma androgens and spermatogenesis. Journal of fish biology 65, 1026-1046.
- Mendes, C., Ramos, S., Bordalo, A., 2014. Feeding ecology of juvenile flounder *Platichthys flesus* in an estuarine nursery habitat: Influence of prey–predator interactions. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 461, 458-468.
- Methven, D.A., Crim, L.W., Norberg, B., Brown, J.A., Goff, G.P., Huse, I., 1992. Seasonal reproduction and plasma levels of sex steroids and vitellogenin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 49, 754-759.
- Moniz, A.B., 2000. Cenários para o sistema socioeconómico das pescas. Pescas e Pescadores. Futuros para o Emprego e os Recursos, Oeiras (Portugal), Celta Editora.
- Monteiro, P.R.R. (2000). O ciclo reprodutivo da solha (*Platichthys flesus* L.): Efeitos da exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Dissertação de Doutoramento. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar na Universidade do Porto, Porto, Portugal.
- Morais, P., Dias, E., Babaluk, J., Antunes, C., 2011. The migration patterns of the European flounder *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758) (Pleuronectidae, Pisces) at the southern

- limit of its distribution range: ecological implications and fishery management. *Journal of Sea Research* 65, 235-246.
- Moulton, S.M., Burton, M.P., 1999. Histological observations on spermatogenesis in winter flounder, *Pleuronectes americanus* Walbaum, from Conception Bay, Newfoundland, Canada. *Canadian journal of zoology* 77, 1682-1689.
- Munroe, T.A. 2010. *Platichthys flesus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T135717A4191586. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20104.RLTS.T135717A4191586.en>. Downloaded on 28 November 2016
- Murua, H., Saborido-Rey, F., 2003. Female reproductive strategies of marine fish species of the North Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic fishery science* 33, 23-31.
- Muus, B.J., Nielsen, J.G., 1999. Sea fish. *Scandinavian Fishing Year Book*.
- Nissling, A., Westin, L., 1997. Salinity requirements for successful spawning of Baltic and Belt Sea cod and the potential for cod stock interactions in the Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 261-271.
- Nunes, C., Silva, A., Soares, E., Gantias, K., 2011. The use of hepatic and somatic indices and histological information to characterize the reproductive dynamics of Atlantic sardine *Sardina pilchardus* from the Portuguese coast. *Marine and Coastal Fisheries* 3, 127-144.
- Oliveira, A.N.D.P (2006). Regulação hormonal da reprodução na solha (*Platichthys flesus* L.): Relação com o ciclo migratório. Dissertação de Doutoramento em Ciências do Meio Aquático. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar na Universidade do Porto, Porto, Portugal. 154pp.
- Orio, A., Bergström, U., Casini, M., Erlandsson, M., Eschbaum, R., Hüsey, K., Lehmann, A., Ložys, L., Ustups, D., Florin, A.-B., 2017. Characterizing and predicting the distribution of Baltic Sea flounder (*Platichthys flesus*) during the spawning season. *Journal of Sea Research* 126, 46-55.
- Palmer, E., Sorensen, P., Adelman, I., 1995. A histological study of seasonal ovarian development in freshwater drum in the Red Lakes, Minnesota. *Journal of Fish Biology* 47, 199-210.
- Peixoto, R. A. F. M. M. 2016. Modelação hidrodinâmica do estuário do Douro: Cenário de cheias e influência dos novos molhes. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia na Universidade do Porto, Porto. Portugal.
- Ramos, C.C.S. (2001). Caracterização e dinâmica da ictiofauna do estuário do rio Douro, nas fases larvar e juvenil. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar na Universidade do Porto, Porto, Portugal. 111pp.
- Ramos, S., Paris, C., Angelico, MM. 2017. Larval fish dispersal along an estuarine-ocean gradient. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 74: 1462-1473 doi: 10.1139/cjfas-2016-0325.

- Ramos, S., Ré, P., Bordalo, A.A., 2010. Recruitment of flatfish species to an estuarine nursery habitat (Lima estuary, NW Iberian Peninsula). *Journal of Sea Research* 64, 473-486.
- Ramsay, K., Witthames, P., 1996. Using oocyte size to assess seasonal ovarian development in *Solea solea* (L.). *Journal of Sea Research* 36, 275-283.
- Ravi, V., Venkatesh, B., 2017. The Divergent Genomes of Teleosts. *Annual Review of Animal Biosciences* 6.
- Ribeiro, F.S.C.P. (2002). *Biologia da Reprodução em fêmeas de Solea lascaris* (Risso, 1810) na costa norte de Portugal. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar na Universidade do Porto, Porto, Portugal. 69pp.
- Rinchard, J., Kestemont, P., 1996. Comparative study of reproductive biology in single- and multiple-spawner cyprinid fish. I. Morphological and histological features. *Journal of fish biology* 49, 883-894.
- Rosenfeld, H., Meiri, I., Elizur, A., 2007. Gonadotropic regulation of oocyte development, *The Fish Oocyte*, Springer, pp. 175-202.
- Schoonen, W., Lambert, J., 1986. Steroid metabolism in the testes of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), during spawning season, under natural conditions and kept in ponds. *General and comparative endocrinology* 61, 40-52.
- Schreck, C.B., Moyle, P.B., 1990. *Methods for fish biology*. American Fisheries Society Bethesda, Maryland.
- Schulz, R.W., De França, L.R., Lareyre, J.-J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology* 165, 390-411.
- Scott, A., Bye, V., Baynes, S., Springate, J., 1980. Seasonal variations in plasma concentrations of 11-ketotestosterone and testosterone in male rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson. *Journal of Fish Biology* 17, 495-505.
- Sobral, M., 2007. Aspectos relativos à biologia reprodutiva da solha, *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758), da Ria de Aveiro e litoral adjacente. *Relatórios científicos e técnicos do IPIMAR, série digital* 44, 1-31.
- Sol, S.Y., Olson, O., Lomax, D., Johnson, L.L., 1998. Gonadal development and associated changes in plasma reproductive steroids in English sole, *Pleuronectes vetulus*, from Puget Sound, Washington. *Fishery Bulletin-National Oceanic and Atmospheric Administration* 96, 859-870.
- Summers, R., 1979. Life cycle and population ecology of the flounder *Platichthys flesus* (L.) in the Ythan estuary, Scotland. *Journal of Natural History* 13, 703-723.
- Tveiten, H., Frantzen, M., Scott, A., Scott, A., 2010. Synthesis of 17, 20 β , 21-trihydroxypregn-4-en-3-one by ovaries of reproductively mature Atlantic cod *Gadus morhua*. *Journal of fish biology* 77, 33-53.

- Tyler, C., Sumpter, J., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in fish biology and fisheries* 6, 287-318.
- Urbatzka, R., Rocha, M., Rocha, E., Norris, D., Lopez, K., 2011. Regulation of ovarian development and function in teleosts. *Hormones and reproduction of vertebrates* 1, 65-82.
- Van der Land, M.A., 1991. Distribution of flatfish eggs in the 1989 egg surveys in the southeastern North Sea, and mortality of plaice and sole eggs. *Netherlands Journal of Sea Research* 27, 277-286.
- Vasconcelos, R., Reis-Santos, P., Costa, M., Cabral, H., 2011. Connectivity between estuaries and marine environment: Integrating metrics to assess estuarine nursery function. *Ecological Indicators* 11, 1123-1133.
- Vasconcelos, R., Reis-Santos, P., Fonseca, V., Maia, A., Ruano, M., França, S., Vinagre, C., Costa, M., Cabral, H., 2007. Assessing anthropogenic pressures on estuarine fish nurseries along the Portuguese coast: a multi-metric index and conceptual approach. *Science of the Total Environment* 374, 199-215.
- Vasconcelos, R., Reis-Santos, P., Fonseca, V., Ruano, M., Tanner, S., Costa, M., Cabral, H., 2009. Juvenile fish condition in estuarine nurseries along the Portuguese coast. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 82, 128-138.
- Vasconcelos, R.P., Reis-Santos, P., Tanner, S., Maia, A., Latkoczy, C., Günther, D., Costa, M.J., Cabral, H., 2008. Evidence of estuarine nursery origin of five coastal fish species along the Portuguese coast through otolith elemental fingerprints. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79, 317-327.
- Vieira, M.E., Bordalo, A.A., 2000. The Douro estuary (Portugal): a mesotidal salt wedge. *Oceanologica Acta* 23, 585-594.
- Vinagre, C., Franca, S., Costa, M., Cabral, H., 2005. Niche overlap between juvenile flatfishes, *Platichthys flesus* and *Solea solea*, in a southern European estuary and adjacent coastal waters. *Journal of Applied Ichthyology* 21, 114-120.
- Weltzien, F.-A., Taranger, G.L., Karlsen, Ø., Norberg, B., 2002. Spermatogenesis and related plasma androgen levels in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 132, 567-575.
- West, G., 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. *Marine and Freshwater Research* 41, 199-222.
- Wieland, K., Jarre-Teichmann, A., Horbowa, K., 2000. Changes in the timing of spawning of Baltic cod: possible causes and implications for recruitment. *ICES journal of marine science* 57, 452-464.
- Young, G., Kagawa, H., Nagahama, Y., 1982. Oocyte maturation in the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): In vitro effects of salmon gonadotropin, steroids, and

cyanoketone (an inhibitor of 3β -hydroxy- Δ 5-steroid dehydrogenase). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 224, 265-275.

Zar, J. H., 1996. *Biostatistica Analysis*. 3rd Ed. Prentice-Hall Internatinal, Inc., USA.

***Capítulo VII* - Anexos**

Tabela A - Resultados do teste de Dunn no comprimento total das fêmeas de solha ao longo dos meses de amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

	abr/17	dez/16	fev/17	jan/17	mai/17	mar/17
dez/16	2,70*					
fev/17	0,28	-2,92*				
jan/17	-0,20	-3,29*	-0,61			
mai/17	-1,06	-3,92*	-1,62	-1,04		
mar/17	2,51*	-0,50	2,82*	3,24*	3,92*	
nov/16	3,42*	1,08	3,63*	3,93*	4,46*	1,59

*p<0,05

Tabela B - Resultados do teste de Dunn no peso total das fêmeas de solha ao longo dos meses de amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

	abr/17	dez/16	fev/17	jan/17	mai/17	mar/17
dez/16	2,29*					
fev/17	-1,63	-4,28*				
jan/17	-1,27	-3,85*	0,41			
mai/17	-0,38	-2,82*	1,34	0,94		
mar/17	1,70*	-0,84*	3,99*	3,48*	2,28*	
nov/16	2,66*	0,68	4,28*	3,95*	3,10*	1,44

*p<0,05

Tabela C - Resultados do teste de Dunn no índice gonodossomático das fêmeas de solha ao longo dos meses de amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

	abr/17	dez/16	fev/17	jan/17	mai/17	mar/17
dez/16	2,04*					
fev/17	-4,30*	-6,57*				
jan/17	-2,30*	-4,57*	2,43*			
mai/17	2,04*	-0,20	7,30*	4,97*		
mar/17	0,09	-2,13*	5,04*	2,72*	-2,17*	
nov/16	2,98*	1,20	6,76*	5,13*	1,45*	3,09*

*p<0,05

Tabela D - Resultados do teste de Dunn no índice hepatossomático das fêmeas de solha ao longo dos meses de amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

	abr/17	dez/16	fev/17	jan/17	mai/17	mar/17
dez/16	1,55					
fev/17	-4,08*	-5,78*				
jan/17	-2,68*	-4,38*	1,65*			
mai/17	-4,29*	-5,83*	-0,76	-2,14*		
mar/17	-0,90	-2,57*	3,55*	1,96*	3,78*	
nov/16	0,39	-0,93	3,68*	2,58*	3,94*	1,16

*p<0,05

Tabela E - Resultados do teste de Dunn no fator de condição das fêmeas de solha ao longo dos meses de amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

	abr/17	dez/16	fev/17	jan/17	mai/17	mar/17
dez/16	-1,06					
fev/17	-5,18*	-3,75*				
jan/17	-2,77*	-1,46	2,92*			
mai/17	1,32	2,42*	7,39*	4,63*		
mar/17	-2,25*	-1,03	3,12*	0,44	-3,93*	
nov/16	-1,70*	-0,77	2,19*	0,34	-2,87*	0,03

*p<0,05

Tabela F - Resultados do teste de Dunn no 17β-estradiol das fêmeas de solha ao longo dos meses de amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017; abr/17: abril de 2017; mai/17: maio de 2017.

	abr/17	dez/16	fev/17	jan/17	mai/17	mar/17
dez/16	1,37					
fev/17	-0,25	-2,03*				
jan/17	-0,25	-1,95*	0,00			
mai/17	0,23	-1,01	0,50	0,49		
mar/17	0,15	-1,39	0,49	0,47	-0,11	
nov/16	1,12	-0,15	1,63	1,58	0,81	1,10

*p<0,05

Tabela G - Resultados do teste de Dunn no comprimento total dos machos de solha ao longo dos meses de amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017.

	dez/16	fev/17	jan/17	mar/17
fev/17	0,10			
jan/17	-1,34	-1,20		
mar/17	2,32*	1,96*	3,61*	
nov/17	0,41	0,23	2,05*	-2,20*

*p<0,05

Tabela H - Resultados do teste de Dunn no peso total dos machos de solha ao longo dos meses de amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017.

	dez/16	fev/17	jan/17	mar/17
fev/17	-0,08			
jan/17	-1,02	-0,74		
mar/17	2,13*	1,95*	3,14*	
nov/17	0,54	0,53	1,82*	-1,88*

*p<0,05

Tabela I - Resultados do teste de Dunn no índice gonodossomático dos machos de solha ao longo dos meses de amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017.

	dez/16	fev/17	jan/17	mar/17
fev/17	1,87*			
jan/17	0,54	-1,58		
mar/17	2,56*	0,61	2,32*	
nov/17	4,06*	1,27	4,08*	0,52

*p<0,05

Tabela J - Resultados do teste de Dunn no índice hepatossomático dos machos de solha ao longo dos meses de amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017.

	dez/16	fev/17	jan/17	mar/17
fev/17	-0,98			
jan/17	-0,76	0,43		
mar/17	-1,52	-0,48	-1,02	
nov/17	-2,78*	-1,20	-2,33*	-0,61

*p<0,05

Tabela K - Resultados do teste de Dunn no fator de condição dos machos de solha ao longo dos meses de amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017.

	dez/16	fev/17	jan/17	mar/17
fev/17	-0,62			
jan/17	0,56	1,12		
mar/17	-1,28	-0,59	-1,84	
nov/17	0,81	1,34	0,29	2,06

*p<0,05

Tabela L - Resultados do teste de Dunn no 11-cetotestosterone dos machos de solha ao longo dos meses de amostragem. nov/16: novembro de 2016; dez/16: dezembro de 2016; jan/17: janeiro de 2017; fev/17: fevereiro de 2017; mar/17: março de 2017.

	dez/16	fev/17	jan/17	mar/17
fev/17	-2,09*			
jan/17	-2,69*	0,62		
mar/17	-1,86*	0,44	-0,11	
nov/17	-0,05	2,16*	3,07*	-0,11

*p<0,05

Tabela M - Resultados do teste de Dunn no índice gonodossomático das fêmeas de solha ao longo dos vários estados de maturação do ovário. REP: Estado de Repouso, PRE: Estado prévitelogénico; VIT: Estado vitelogénico; VITT: Estado vitelogénico tardio; POS: Estado de pós-desova.

	REP	PRE	VIT	VITT
PRE	-1,28			
VIT	-2,85*	-1,54		
VITT	-5,87*	-4,55*	-3,12*	
POS	-1,50	-0,36	0,98	3,50*

*p<0,05

Tabela N - Resultados do teste de Dunn no índice hepatossomático das fêmeas de solha ao longo dos vários estados de maturação do ovário. REP: Estado de Repouso, PRE: Estado pré-vitelogénico; VIT: Estado vitelogénico; VITT: Estado vitelogénico tardio; POS: Estado de pós-desova.

	REP	PRE	VIT	VITT
PRE	-0,22			
VIT	-1,17	-0,96		
VITT	-3,11*	-2,97*	-2,10*	
POS	-0,92	-0,74	0,07	1,71*

*p<0,05

Tabela O - Resultados do teste de Dunn no fator de condição das fêmeas de solha ao longo dos vários estados de maturação do ovário. REP: Estado de Repouso, PRE: Estado pré-vitelogénico; VIT: Estado vitelogénico; VITT: Estado vitelogénico tardio; POS: Estado de pós-desova.

	REP	PRE	VIT	VITT
PRE	0,51			
VIT	-0,69	-1,27		
VITT	-1,16	-1,83*	-0,46	
POS	1,60*	1,17	2,35*	2,91*

*p<0,05

Tabela P - Resultados do teste de Dunn no 17β -estradiol das fêmeas de solha ao longo dos vários estados de maturação do ovário. REP: Estado de Repouso, PRE: Estado pré-vitelogénico; VIT: Estado vitelogénico; VITT: Estado vitelogénico tardio; POS: Estado de pós-desova.

	REP	PRE	VIT	VITT
PRE	-0,64			
VIT	-1,61	-0,91		
VITT	-4,65*	-3,87*	-3,18*	
POS	-0,31	0,28	1,14	3,80*

* $p < 0,05$

Tabela Q - Resultados do teste de Dunn no índice gonodossomático dos machos de solha ao longo dos vários estados de maturação do testículo. PM: Estado de prematuração; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação tardia; POS: Estado de pós-postura ou repouso.

	PM	EM	MT
EM	-2,80*		
MT	-2,24*	0,96	
POS	0,90	3,68*	3,19*

* $p < 0,05$

Tabela R - Resultados do teste de Dunn no índice hepatossomático dos machos de solha ao longo dos vários estados de maturação do testículo. PM: Estado de prematuração; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação tardia; POS: Estado de pós-postura ou repouso.

	PM	EM	MT
EM	1,24		
MT	2,08*	1,10	
POS	2,27*	1,53	0,86

* $p < 0,05$

Tabela S - Resultados do teste de Dunn no fator de condição dos machos de solha ao longo dos vários estados de maturação do testículo. PM: Estado de prematuração; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação tardia; POS: Estado de pós-postura ou repouso.

	PM	EM	MT
EM	0,81		
MT	-0,02	-1,22	
POS	2,37*	2,05*	2,93*

* $p < 0,05$

Tabela T - Resultados do teste de Dunn no 11-cetotestosterone dos machos de solha ao longo dos vários estados de maturação do testículo. PM: Estado de prematuração; EM: Estado em maturação; MT: Estado de maturação tardia; POS: Estado de pós-postura ou repouso.

	PM	EM	MT
EM	0,03		
MT	-2,26*	-3,10*	
POS	1,67*	1,94*	-3,10

*p<0,05