DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

KAINÃ ROCHA CABRERA FAGUNDES

Mudanças morfofisiológicas sazonais durante o ciclo reprodutivo da prejereba (*Lobotes surinamensis* BLOCH 1970) (Perciformes: Lobotidae) em ambiente natural

Seasonal morphophysiological changes during the reproductive cycle of tripletail (*Lobotes surinamensis* BLOCH 1970) (Perciformes: Lobotidae) in natural environment

São Paulo

2019

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

KAINÃ ROCHA CABRERA FAGUNDES

Mudanças morfofisiológicas sazonais durante o ciclo reprodutivo da prejereba (*Lobotes surinamensis* BLOCH 1970) (Perciformes: Lobotidae) em ambiente natural

Seasonal morphophysiological changes during the reproductive cycle of tripletail (*Lobotes surinamensis* BLOCH 1970) (Perciformes: Lobotidae) in natural environment

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton

Co-orientador: Dr. Renato Massaaki Honji.

São Paulo

2019

Ficha catalográfica

Fagundes, Kainã R.C.

Mudanças morfofisiológicas sazonais durante o ciclo reprodutivo da prejereba (*Lobotes surinamensis* BLOCH 1970) (Perciformes: Lobotidae) em ambiente natural. 54p.

1 – Controle endócrino reprodutivo; 2 – Esteroides gonadais; 3 – Teleósteo marinho; 4 – Neotrópico

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2019. Departamento de Fisiologia

Comissão julgadora

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

Dedico esse trabalho:

À minha família;
À biodiversidade;
À preservação ambiental; e
A todo(a)s cientistas da natureza.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a natureza e os mares, por me cativar e seduzir desde que me conheço por gente. O mar e a comunidade caiçara são meu lar, minha história e minha luta. Desenvolver esse trabalho me permitiu mergulhar mais em relações desconfiadas, seja com o conteúdo, seja com as dificuldades que passei e que hoje me solidificaram como pessoa e como profissional, cada vez mais amante da natureza.

Agradeço a minha família, mesmo que pequena, tem muita história e vida intensa. A minha mãe, minha alma gêmea de nervos de aço, mas com a bondade justa e rebeldia e vanguardismo que sempre admirei, obrigado dona Sol. Ao meu pai, um guerreiro, que vive até hoje como exemplo de companheirismo, parceria e amizade, sempre vou confiar em você pai, o meu Rei. Ao meu irmão, Kauã, obrigado por ser o meu amigo e parceiro, nos inspiramos confiança e afeto e compartilhamos o mesmo senso de justiça e amor a natureza. Ao meu avô, seu Zé, que partiu em meio minha viagem a Manaus, nem deixou nos despedirmos, porque, sagaz como sempre foi, sabia que a vida não é jogo e sim um livro.

Agradeço ao LAMEROA por me acolher como segunda família, tive a oportunidade de conhecer pessoas incríveis que me ajudaram muito em toda minha jornada no laboratório, pessoas humanas, respeitosas e éticas. A Profa Renata, ou Re, que nunca desistiu de mim, mesmo quando quis desistir de tudo. Re, muito obrigado por me orientar de forma humana e compreensiva, a sua fama de mãezona não é à toa, o seu coração abraça sem julgamento e cheio de empatia cada orientado. Muito obrigado por existir na minha vida, sempre me lembrarei de você, Re. Ao Renato Honji, muito obrigado por sempre estar disposto a me formar como cientista e como pessoa, a sua ética e dedicação me inspiram. E meu orientador de campo, o Carlos “Jaboti”, que em nossas viagens de campo a Paraty renderam histórias que marcaram minha vida. A sua simplicidade, altruísmo e animação fizeram os dias mais difíceis de coleta melhores. Quero guardar essa amizade pra sempre e muito obrigado por confiar em mim em desenvolver esse trabalho em parceria, senti-me honrado e espero que os resultados obtidos te façam feliz como pessoa e como cientista.

Uma pessoa de extrema importância para o desenvolvimento desse trabalho foi a minha primeira amiga de pós-graduação, a Maria, uma peruana doce, extremamente inteligente e leal aos amigos. Muito obrigado por todo desgaste mental para desenvolver o protocolo de análises de expressão genica, você conseguiu o que parecia impossível e devo muito a você! Estivemos juntos no processo seletivo, fizemos disciplinas e estamos nessa reta final juntos, e com certeza, muito devo a você.

Outras pessoas marcantes do LAMEROA, como a Aline e o Cadu (incluindo a fofura da Gi, que pude ter a honra de ver bebezinha), a Gabi, Jose, Filipe, Rapha (quanta saudade Raphinha!), Marcela, JP, Bia, Giovana, Fernanda, Vagner, Val, Paulo, Bruno Bambi, Bruno Frango, aos alunos de IC e todo o pessoal desse laboratório que me acolheu de braços abertos. Sentirei saudade das cervejas e papos fervorosos no CA da Bio.

Aos professores e funcionários do IB que sempre foram prestativos e dedicados na nossa formação e fazendo as coisas acontecerem e darem certo. Em sala de aula, redescobri o que é estudar biologia e admirar toda a potência dos organismos e tudo que os cercam.

Agradeço a FAPESP (processos: 2014/16320-7 e 2017/10971-4) por ser bolsista e por todo apoio financeiro para que o trabalho pudesse ser executado, seja em campo, laboratório e apresentação dos resultados em congresso. Agradeço a PROAP pelo financiamento das coletas.

Agradeço demais a todos os pescadores da Ilha Itacá, a nossa “base” de alojamento e coleta. Agraço principalmente ao sr. Rubinho, o pescador-chefe da Ilha e a sua esposa Dona Rose, por nos abrigarem e dividir o pão e o peixe comigo. Não houve um momento em que me senti sozinho na Ilha, sempre rodeado de boas histórias e conhecimentos seculares de pesca e sobre o mar. Agradeço ao Matheus por se esforçar ao máximo para me ajudar a coletar as prejerebas, um dos alimentos base da comunidade caiçara. Eu aprendi o que é viver da natureza com a natureza, aprendi que é uma vida difícil, dolorida e revigorante a cada batida de rede cheia de peixes.

Agradeço a todas as prejerebas que foram pescadas e sacrificadas, e com o maior respeito, espero que os meus resultados sirvam para a conservação de sua espécie, dos seus colegas taxonômicos e a sua casa!

Agradeço aos moradores do CRUSP que sempre abriram as portas e tive histórias lindas e intensas no meu primeiro lar no início da pós. Agradeço a SAS e aos

funcionários dos RU “bandejão” por serem cordiais e me salvarem da fome com comida de qualidade.

Agradeço a todos meus amigos que fiz durante a pós, principalmente aos meus amigos da República do Castelo, aos meus grandes amigos Paula (minha mais que irmã, a minha parceira e cúmplice), Dionisio, Jackeline (minha maior inspiração como mulher negra, como irmã, como praticante de religião de matriz africana e cientista contra a força genocida do patriarcado sobre o corpo da mulher negra), Uira, Dani, Ju, Nanda, Marquinhos e Rafa. Essa casa é histórica e muito obrigado por permitir fazer história. Salve Morro do Querosene.

Obrigado a todos e a tudo que estiveram ao meu lado, mesmo que não me recorde ou não caiba tudo que gostaria de agradecer, saibam que minha gratidão e honra serão eternas!

Índice

Lista de abreviações i

Lista de tabelas iv

Lista de figuras v

Resumo viii

Abstract x

1. Introdução 1

2. Objetivos 10

2.1. Objetivo geral 10

2.2. Objetivos específicos 10

3. Material e métodos 11

3.1. Obtenção de animais 11

3.2. Dados biológicos 11

3.3. Dados de temperatura da água 12

3.4. Análise histológica das gônadas 12

3.5. Concentração dos esteroides gonadais 14

3.6. Distribuição do diâmetro-frequência oocitária, número de oócitos em desenvolvimento (NDO) e cálculo do *batch fecunudity*14

3.7. Expressão gênica das gonadotropinas hipofisárias (fsh*β* e lh*β*) 15

3.8. Análise estatística 17

4. Resultados 18

4.1. Dados morfométricos 18

4.2. Dados de temperatura da água 21

4.3. Dados morfológicos das gônadas 21

4.3.1. Fêmeas 21

4.3.1.1. Primavera 23

4.3.1.2. Verão 23

4.3.1.3. Outono/Inverno 23

4.3.2. Machos 25

4.3.2.1. Primavera 27

4.3.2.2. Verão 27

4.3.2.3. Outono/Inverno27

4.4. Perfil dos esteroides sexuais 29

4.4.1. Fêmeas 29

4.4.1.1. 17β-Estradiol (E2) 29

4.4.1.2. 11-cetotestosterona (11-KT) 29

4.4.1.3. 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) 30

4.4.2. Machos 31

4.4.2.1. Testosterona (T) 31

4.4.2.2. 11-cetotestosterona (11-KT) 31

4.5. Distribuição do diâmetro-frequência oocitária, número de oócitos em desenvolvimento (NDO) e cálculo do *batch fecunudity*32

4.6. Avaliação da expressão gênica do fsh*β* e lh*β* hipofisário 34

5. Discussão 36

6. Conclusões 43

7. Referências 44

Lista de abreviações

SNC – Sistema Nervoso Central

HHG – Hipotálamo-hipófise-gônadas

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotropinas

GtH – Gonadotropinas

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

LH – Hormônio Luteinizante

P450scc – P450 de clivagem de cadeia lateral

P5 – Pregnenolona

P4 – Progesterona

3β-HSD – 3 beta-hidroxiesteroide desidrogenase

17-OHP5 – 17-hidroxipregnenolona

17OHP4 ou 17OHP – 17-hidroxiprogesterona

17,20βP – *17,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one*

DHP – Dihidroprogesterona

MIS – Esteroide indutor da maturação

20β-HSD – 20 beta-hidroxiesteroide desidrogenase

P450c17 – 17-hidroxilase

17β-HSD – 17 beta-hidroxiesteroide desidrogenase

T – Testosterona

11-KT – 11-cetotestosterona

11β-HSD – 11 beta-hidroxiesteroide desidrogenase

E2 – 17β-estradiol

P450arom – P450 aromatase

PGCs – *Primary Germinative Cells* (Células germinativas primordiais)

PGOs – *Primary Growth Oocytes* (Oócitos de crescimento primário)

Vtg – Vitelogenina

VLDL – *Very Low Density Lipoproteins* (Lipoproteínas de muita baixa densidade)

FOM – *Final Oocyte Maturation* (Maturação final do oócito)

17,20β, 21-P – *17,20β,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one*

MPF – *Maturation Promoting Factor* (Fator promotor da maturação)

SST – *Superficial Sea Temperature* (Temperatura superficial do mar, ou TSM)

NASA – *National Aeronautics and Space Administration*

DSA – Divisão de Satélites e Sistemas Ambientais

CPTEC – Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos

INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

g – Grama

cm - Centímetros

IHS – Índice hepatossomático

IGS – Índice gonadossomático

W – *Weight* (massa)

HE – Hematoxilina e Eosina

Vtg1 – Vitelogênese 1

Vtg2 – Vitelogênese 2

Vtg3 – Vitelogênese 3

POF – *Post Ovulatory Follicule* (Folículo pós-ovulatório)

CV – Coeficiente de variação

NDO – *Number of Developing Oocytes* (Número de oócitos em desenvolvimento)

Ov – Volume do ovário

K–Coeficiente da distribuição do tamanho do oócito

β –Forma do coeficiente

Na – Número de oócito Vtg2/Vtg3 transectados por unidade de área

Vi – Fração do volume ocupado pelo Vtg2/Vtg3 na seção histológica

M_1 – Média do diâmetro oocitário

M_3– Terceiro momento para a média da distribuição do oócito

D – Diâmetro do oócito individual

L – *Longest* (Maior)diâmetro mensurado na seção histológica

S – *Shortest* (Menor)diâmetro mensurado na seção histológica

fshβ – gene da subunidade β do FSH

lhβ – gene da subunidade β do LH

EF1α – gene do fator de elongação 1α

PCR-RT – *Polymerase Chain Reaction* – Real Time

cDNA – DNA complementar

NO – Ninho de oogônias

OP – Oócito perinucleolar

SG – Espermatogônia

SC – Espermatócito

ST – Espermátide

SP – Espermatozoide

ESEC Tamoios – Estação Ecológica Tamoios

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados morfométricos durante o ciclo reprodutivo da prejereba *Lobotes surinamensis* em ambiente natural na Baía de Paraty, Rio de Janeiro. Índice Hepatossomático (IHS) e Índice Gonadossomático (IGS). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre as estações do ano (P<0,05) **19**

Lista de figuras

Figura 1. Vista lateral de *Lobotes surinamensis*. Barra: 5 cm **20**

Figura 2. Localização geográfica da Baía da Ilha Grande (Antunes; Peixoto, 2017). **20**

Figura 3. Médias de temperatura superficial oceânica da baía da Ilha Grande durante a noite. **21**

Figura 4. Fotomicrografia dos tipos celulares presentes no ovário durante o ciclo reprodutivo da prejereba *Lobotes surinamensis*. A.: presença de ninho de oogônias (NO) (*inset*), na magnificação do canto superior direito (barra: 10µm). Células com citoplasma com maior volume, sendo os oócitos perinucleolares (OP) com núcleo (N) com nucléolos acidófilos periféricos (cabeça de seta). B.: oócitos em processo de vitelogênese lipídica inicial (Vtg1) com formação de alvéolos corticais (seta), núcleo (N), além de oócitos perinucleolares (OP). C.: oócitos em diferentes estágios, desde oócitos perinuclolares (OP), em vitelogênese lipídica com depósito de lipídio (*) (Vtg2) e vitelogênese avançada (Vtg3) já com membrana vitelina espessa (cabeça de seta). Observa-se a presença de nucléolos na periferia do núcleo (seta). D.: oócitos vitelogênicos avançados (Vtg3) com deposição vitelínica (*) envolvidos pela membrana vitelina (cabeça de seta) e separados por células foliculares (F). Barra: 25µm. Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE). **22**

Figura 5. Fotomicrografia dos estádios reprodutivos de fêmeas da prejereba *Lobotes surinamensis* durante as estações do ano. A.: Primavera. Ovário "em desenvolvimento" e "capaz de desovar" com oócitos Vtg3 (seta) e folículos em desenvolvimento primário (cabeça de seta). Barra: 400 µm. B.: Verão. Ovário "capaz de desovar" com oócitos Vtg3, folículos em desenvolvimento primário (cabeça de seta). Barra: 100 µm. C.: Outono. Ovário "regenerando"/"desenvolvendo" com oócitos perinucleolares (OP) (cabeça de seta), em desenvolvimento primário. Envolto por túnica muscular espessa (*). Barra: 100 µm. D.: Ovário "regenerando"/"desenvolvendo" com oócitos perinucleolares (OP) (cabeça de seta), em desenvolvimento primário. Envolto **24**

por túnica muscular espessa (*). Barra: 100 µm. Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE).

Figura 6. Fotomicrografia dos tipos celulares presentes no testículo durante o ciclo reprodutivo da prejereba L. surinamensis. A.: visão geral de um corte testicular, evidenciando os lóbulos (pontilhado vermelho) do testículo do tipo irrestrito lobular. Barra: 400 µm. B.: lóbulo (L) contendo diferentes estádios de desenvolvimento de células germinativas. Barra: 50 µm. Magnificação do lóbulo (insight), destacando a presença de espermatogônias (SG) indicado por setas; espermatócitos (SC) indicados pela cabeça de seta e espermátides (ST). Barra: 10 µm. C.: testículo com túbulos contendo espermatozoides (SP) no lúmen; espermátides (ST) e espermatócitos (SC) em cistos; e espermatogônias (SG). Barra: 25 µm. Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE). **26**

Figura 7. Fotomicrografia dos estádios reprodutivos de machos da prejereba *Lobotes surinamensis* durante as estações do ano. A.: Primavera. Testículo com "desenvolvimento" e "capaz de espermiar" com espermatozoides (cabeça de seta) nos ductos espermáticos mais internos e células germinativas em diferentes estágios (seta) a periferia do testículo. Barra: 400 µm. B.: Verão. Indivíduos "capazes de espermiar" e "regredindo", com ductos espermáticos contendo espermatozoides (cabeça de seta) e ductos espermáticos com resquícios de espermatozoides (seta). Pode-se observar o ducto espermático principal (*). Barra: 400 µm. C.: Outono. Testículo "em regeneração" com a presença de espermatócitos (seta) e espermátides (cabeça de seta), ambas em cisto. Barra: 25 µm. D.: Inverno. Testículo "em desenvolvimento", com ductos espermáticos contendo espermatozoides (cabeça de seta) e células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento (seta). Barra: 100 µm. Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE). **28**

Figura 8. Concentração plasmática (pg/mL) de 17β-Estradiol (E2) durante o ciclo reprodutivo anual das fêmeas da prejereba *Lobotes surinamensis* em ambiente natural naBaía da Ilha Grande, Rio de Janeiro. [ab]Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as estações (P<0,001). **29**

Figura 9. Concentração plasmática (pg/mL) de 11-cetotestosterona (11-KT) durante o ciclo reprodutivo anual das fêmeas da prejereba *Lobotes surinamensis* em ambiente natural na Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro (P=0,143). **30**

Figura 10. Concentração plasmática (ng/mL) de 17-hidroxiprogesterona (17OHP) durante o ciclo reprodutivo anual das fêmeas da prejereba Lobotes surinamensis em ambiente natural na Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro (P=0,384). **30**

Figura 11. Concentração plasmática (pg/mL) de testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT) durante o ciclo reprodutivo anual de machos da prejereba *Lobotes surinamensis* em ambiente natural na Baía de Paraty, Rio de Janeiro. [ab]Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as estações para cada hormônio (P=0,213 para T e P=0,022 para 11KT). **31**

Figura 12. Frequência de ocorrência (%) dos diferentes estádios de desenvolvimento oocitário de *L. surinamensis*durante as estações do ano em ambiente natural. Oogônias (OG), perinucleolares (PN), vitelogênese 1 (Vtg1), vitelogênese 2 (Vtg2) e vitelogênese 3 (Vtg3). **32**

Figura 13. Número de oócitos em desenvolvimento (NDO) em fêmeas de *Lobotes surinamensis* com vitelogênese avançada nas estações de primavera e verão na baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro (P=0,151). **33**

Figura 14. *Batch fecundity* em fêmeas de *L. surinamensis* em ambiente natural na primavera**.** **33**

Figura 15. *Batch fecundity* em fêmeas de *L. surinamensis* em ambiente natural no verão**.** **34**

Figura 16. Expressão genica do fsh*β* hipofisário de *Lobotes surinamensis* durante o ciclo reprodutivo em ambiente natural. Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro (P= 0,334 nas fêmeas e P=0,901 nos machos). **35**

Figura 17. Expressão genica do lh*β* hipofisário de *Lobotes surinamensis* durante o ciclo reprodutivo em ambiente natural. Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro.[ab]Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as estações para em cada sexo (P = 0,027 nas fêmeas e P= 0,011 nos machos). **35**

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo estudar a morfologia e fisiologia reprodutiva de *Lobotes surinamensis* em ambiente natural, reunindo informações que permitam trabalhos aplicados na produção e conservação desta espécie. Machos e fêmeas adultos foram coletados na Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro durante a primavera (outubro-novembro-dezembro), verão (janeiro-fevereiro-março), outono (abril-maio-junho) e inverno (julho-agosto-setembro). Os perfis plasmáticos dos esteroides gonadais, 17β-estradiol (E2), 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) e 11-cetotestosterona (11-KT) foram analisados em fêmeas, e a concentração de testosterona (T) e 11-KT nos machos. Análises histológicas das gônadas foram realizadas como uma ferramenta para avaliação morfológica, que foi corroborada com os dados fisiológicos, durante o ciclo reprodutivo. Foram analisadas ainda a expressão gênica hipofisária do fsh*β* e lh*β* e a fecundidade relativa pelo número de oócitos desenvolvidos. Durante a primavera e verão, as fêmeas estavam com os ovários desenvolvidos e capazes de desovar, com oócitos vitelogênicos e desenvolvidos, e zona radiata bem evidente. No outono e inverno, as fêmeas estavam se preparando para o período reprodutivo, com predomínio de ninhos de oogônias e oócitos perinucleolares de uma forma geral. A concentração plasmática de E2 se manteve elevada nas fêmeas durante a primavera em relação ao verão e outono/inverno. O perfil anual deste esteroide nas fêmeas de *L. surinamensis* pode ser relacionado com o grau de desenvolvimento do folículo ovariano, observado na histologia. Já a concentração plasmática de 11-KT foi inversa ao observado para o E2, com baixa concentração na primavera e tendência à elevação no inverno, corroborando com o papel da 11-KT no crescimento primário dos oócitos. A concentração plasmática de 17-OHP nas fêmeas não apresentou diferenças significativas entre as estações, o que sugere que este não seja o progestágeno ativo em teleósteos, mas sim o precursor do esteroide indutor da maturação final (MIS). Na primavera e no verão, o lh*β* apresentou expressão maior do que no período outono/inverno em fêmeas, enquanto o fsh*β* se manteve com níveis de expressão constante durante todas as estações. Nos machos, a análise histológica dos testículos, mostrou que na primavera e no verão, os ductos espermáticos estavam preenchidos com espermatozoides, evidenciando o período de espermiação, já no período outono/inverno

houve predominância de cistos de espermatogônias e as células em diferentes estágios de desenvolvimento, o que corresponde a uma fase de maturação inicial, ou seja, preparação para o período reprodutivo. A concentração plasmática de T nos machos se manteve estável ao longo das estações, já a concentração plasmática de 11-KT foi mais elevada na primavera quando comparada ao período outono/inverno. Na primavera e verão, a expressão de lhβfoi mais elevada que no período outono/inverno, enquanto de forma similar às fêmeas, os níveis de expressão de fshβnão se alteraram ao longo das estações. As análises de expressão destas gonadotropinas, associadas à concentração dos esteroides gonadais e à morfologia gonadal deixou evidente que o pico do período reprodutivo de *L. surinamensis* ocorre na primavera, estendendo-se até o verão.

Abstract

The present study aimed to study the morphology and reproductive physiology of *Lobotes surinamensis* in a natural environment, gathering information that allows applied works in the production and conservation of this species. Adult males and females were collected in the Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro during the spring (October-November-December), summer (January-February-March), autumn (April-May-June) and winter (July-August-September). Plasma profiles of gonadal steroids, 17β-estradiol (E2), 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) and 11-ketotestosterone (11-KT) were analyzed in females, and the concentration of testosterone (T) and 11-KT in males. Histological analyzes of the gonads were performed as a tool for morphological evaluation, which was corroborated with the physiological data, during the reproductive cycle. The genetic expression of fsh*β* and lh*β* and the relative fecundity by the number of developed oocytes were also analyzed. During spring and summer, the females had the ovaries developed and capable of spawning, with vitellogenic and developed oocytes, and a well evident radiata zone. In autumn and winter, females were preparing for the reproductive period, with a predominance of nest of oogonia and perinucleolar oocytes in general. The plasma concentration of E2 remained higher in females during the spring in relation to summer and autumn/winter. The annual profile of this steroid in *L. surinamensis* females may be related to the degree of development of the ovarian follicle observed in histology. The plasma concentration of 11-KT was inversely of that observed for E2, with a low concentration in the spring and a tendency to increase in winter/autumn, corroborating the role of 11-KT in the primary oocyte growth. The plasma concentration of 17-OHP in the females did not present significant differences between the seasons, suggesting that this is not the active progestogen in teleosts, but the precursor of the final maturation inducing steroid (MIS). In spring and summer, lh*β* presented higher gene expression than in the autumn/winter period in females, while fsh*β* remained with constant expression levels during all seasons. In males, the histological analysis of the testicles showed that in the spring and summer, the sperm ducts were filled with spermatozoa, evidencing the period of spermiation, whereas in the autumn/winter period there was a predominance of cysts of spermatogonia and cells in different stages of. development, which corresponds to an initial maturation stage, that is, the preparation for the reproductive period. The plasma concentration of T in

males remained stable throughout the seasons, whereas the plasma concentration of 11-KT was higher in the spring when compared to the autumn/winter period. In spring and summer, the expression of lh*β* was higher than in the autumn/winter period, while similarly to females, fsh*β* expression levels did not change over the seasons. The analysis of the expression of these gonadotropin genes, associated with the concentration of gonadal steroids and gonadal morphology, made it evident that the peak of the reproductive period of *L. surinamensis* occurs in the spring, extending until the summer.

1. Introdução

Os organismos apresentam interações intraespecíficas, interespecíficas, além de interações com as variáveis ambientais. Na interação organismo-ambiente, o indivíduo percebe o ambiente, interpreta as mudanças ocorridas em seu entorno e depois traduz essa informação em uma resposta neural e/ou hormonal que finalmente regula as respostas morfológicas, fisiológicas e comportamentais. Em princípio esses fenômenos foram estudados por De Wilde (1978) e revisado por Wingfield et al. (2011). Em geral, a percepção das mudanças nas condições ambientais envolve dois processos principais, segundo Wingfield et al. (1998):

a) Através da *resposta celular direta* às condições ambientais (como temperatura, osmolaridade, pH, e etc.) que não envolve ação nervosa ou hormonal. São exemplos destas respostas, as células mucosas do trato gastrointestinal moduladas por mudanças de pH e também as células de cloreto das brânquias dos peixes frente à osmolaridade da água.
b) Ou ainda pela *resposta celular indireta*, através do estímulo ambiental percebido por sensores no organismo, conduzidos aos centros integradores, por exemplo, o sistema nervoso central (SNC), e respondendo ao estímulo por ação nervosa e/ou endócrina com ação morfofuncional e comportamental.

Nesse último caso, essa resposta garante o equilíbrio dinâmico, ou seja, o conceito de homeostase, redefinido por Cannon (1929), onde basicamente o organismo detecta e responde aos desvios das variáveis fisiológicas, culminando em respostas efetoras que restauram as variáveis para faixa fisiológica ideal por retroalimentação negativa (do inglês, *feedback*). Apesar desse conceito ter sido aplicado na interação interna no organismo, ele pode ser facilmente estendido para a interação organismo-ambiente.

Dentre os diversos ambientes, o aquático ocupa três quartos do planeta Terra, sendo que o bioma marinho abrange 70% da superfície terrestre (Field et al., 1998). O oceano se distribui em pelo menos 50 regiões biogeográficas (Longhurst, 2010) e a maioria delas, em geral, estão sob controle da interface oceano-atmosfera, como

insolação, ventos, correntes marinhas e tempestades (Mann; Lazier, 2013). Tais fatores abióticos somados ao bióticos, como produtividade primária, por exemplo, contribuem para a heterogeneidade ambiental em escala temporal e espacial, criando diversas condições (Horne; Schneider, 1994), permitindo a construção de habitats e nichos. A heterogeneidade ambiental assim como a sensibilidade dos organismos marinhos às variáveis ambientais, gera as amplas respostas biológicas. A sensibilidade varia intra e inter-especificamente e as respostas dos organismos irão ocorrer nos diferentes níveis de organização (Pörtner et al., 2014).

Nas diferentes espécies do grupo Actinopterygii (peixes com nadadeiras raiadas), assim como na maioria dos animais ectotérmicos, a temperatura, assim como o fotoperíodo, são variáveis ambientais fundamentais na regulação das diversas atividades biológicas, principalmente no controle de todos os processos reprodutivos: da gametogênese até o desenvolvimento larval (Pankhurst; Munday, 2011). Nos craniados, as variáveis ambientais e comportamentos sociais são transduzidos ao SNC e os processos reprodutivos são controlados endogenamente pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG). Os corpos celulares de neurônios presentes principalmente no hipotálamo sintetizam e secretam o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH). Nos teleósteos, o sistema porta hipofisário é ausente, então, as fibras nervosas hipotalâmicas se ramificam ao longo da adeno-hipófise, secretando o GnRH, que estimula a síntese e secreção das gonadotropinas (GtH), como os hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH), que modulam muitos aspectos do desenvolvimento gonadal, agindo tanto nos ovários quanto nos testículos, regulando a esteroidogênese, a foliculogênese, a ovulação e a espermatogênese (Levavi-Sivan et al., 2010; Zohar et al., 2010). Os hormônios esteroidais gonadais também atuam no hipotálamo e/ou na hipófise para regular positivamente ou negativamente a síntese e secreção de LH e FSH (Levavi-Sivan et al., 2010).

Os hormônios esteroides são derivados do colesterol e encontrados nos cordados e artrópodes, e em ambos os táxons são importantes na reprodução (Young et al., 2005). Nos craniados adultos, três esteroides estão relacionados à reprodução: estrogênios, androgênios e progestágenos (Young et al., 2005), que são produzidos principalmente em células especializadas nas gônadas. Estas células expressam genes de enzimas que atuam na via esteroidogênica cujos produtos modificam o colesterol e seus derivados

atuando nas células germinativas, glândulas reprodutivas e acessórias e no comportamento sexual (Young et al., 2005).

A síntese de esteroides se inicia a partir da conversão do colesterol por enzimas da família do citocromo P450. A primeira enzima da família, a P450 de clivagem de cadeia lateral (P450scc), localizada na região interna da membrana mitocondrial, converte o colesterol em pregnenolona (P5), sendo substrato para a síntese da progesterona (P4) convertida pela enzima 3β-HSD (3 beta-hidroxiesteroide desidrogenase). Os subprodutos da P4, a 17-hidroxipregnenolona (17-OHP5) e a 17-hidroxiprogesterona (17-OHP4), podem ser convertidos em 17,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20βP) [ou DHP (dihidroprogesterona) ou MIS (do inglês, *Maturation Inducing Steroid*, traduzindo, esteroide indutor da maturação)] pela enzima 20β-HSD (20 beta-hidroxiesteroide desidrogenase) dependendo da fase do ciclo reprodutivo (Lubzens et al., 2010). A 17-OHP5 e a 17-OHP4 também são convertidas pelas enzimas $P450_{c17}$ (17-hidroxilase), 3β-HSD e 17β-HSD (17 beta-hidroxiesteroide desidrogenase) em testosterona (T), que é convertida em 11-cetotestoterona (11-KT) pela enzima 11β-HSD (11 beta-hidroxiesteroide desidrogenase) ou em 17β-estradiol (E2) pela $P450_{arom}$ (P450 aromatase) (Lubzens et al., 2010).

O 11-KT era até então considerado esteroide exclusivo de teleósteos (Schulz; Miura, 2002), todavia, estudos recentes demonstram que o 11-KT está presente também nas gônadas humanas e representa um dos principais andrógenos humanos (tanto masculino quanto feminino) (Imamichi et al., 2016), que assim como nos teleósteos é produzido pelas células de *Leydig* (testículos) e na teca (folículo ovariano) (serão melhores detalhadas no decorrer do texto). Apesar de já conhecer a síntese do 11-KT em humanos desde o século passado (Zhao; Li, 1994), os efeitos desse esteroide nos mamíferos ainda não são totalmente compreendidos.

Os ovários das fêmeas dos Actinopterygii estão localizados nos antímeros laterais na cavidade corpórea e constituídos pelos folículos ovarianos, formados pelo oócito envolto pelas células granulosas, lâmina basal e pela teca (camada somática) (Grier, 2000). Os principais estágios do desenvolvimento oocitário e folicular incluem: formação das células germinativas primordiais (PGCs, do inglês *Primordial Germinative-Cells*), a maturação das PGCs em oogônias, em seguida em oócitos de crescimento primário (PGOs, do inglês *Primary Growth Oocytes*) pelo início da meiose,

formação dos alvéolos corticais, a vitelogênese e desenvolvimento oocitário até a maturação final e ovulação/desova (Patiño; Sullivan, 2002).

A formação das PGCs ocorre a partir do desenvolvimento de células germinativas e elas geram gametas (em ambos os sexos). Logo após a fecundação do oócito e durante os estágios iniciais da embriogênese, um número pequeno de PGCs não divisíveis é produzido (Lubzens et al., 2010). A formação de oogônias a partir das PGCs ocorre pela diferenciação sexual por andrógenos e estrógenos, que no caso das fêmeas, pelo E2 a partir da secreção da teca e granulosa por estímulo do FSH (Hughes, 2001; Ross; Capel, 2005). A transformação das PGCs em oogônias envolve mudanças estruturais no interior das PGCs e cada oogônia multiplica-se por divisões mitóticas por ação do E2 formando ninhos de oogônias com as células pré-foliculares, que se desenvolvem para formar o folículo (Lubzens et al., 2010).

A formação do folículo caracteriza os PGOs, ou seja, nessa transição, as oogônias sofrem a primeira divisão meiótica por ação do DHP, e permanecem na prófase I, antes de deixarem o ninho de oogônias (Selman et al., 1993; Lubzens et al., 2010). Os núcleos dos oócitos sofrem divisões migram núcleos para a periferia (perinucleolar) até a formação de alvéolos corticais, ou seja, iniciam-se as primeiras deposições de glicoproteínas, ou vitelo primário, que se aglomeram pelo citoplasma em vesículas; transitando do crescimento primário para o secundário (Selman et al., 1993; Patiño et al., 2001; Patiño; Sullivan, 2002). Nesse período, o FSH atua nas células da teca fornecendo substrato androgênico, para as células granulosas que expressam $P450_{arom}$, convertendo T em E2 (Nagahama, 1994; Senthilkumaran et al., 2004; Young et al., 2005). Um estudo posterior demonstrou *in vitro* na enguia austral (*Anguilla australis*, Anguilliformes), que o 11-KT pode exercer efeitos diretos sobre o ovário, resultando no crescimento dos oócitos pré-viletogênicos (Lokman et al., 2007).

Apesar destes registros do efeito do 11-KT no crescimento oocitário, esta informação ainda está disponível para um reduzido número de espécies. O que se conhece na literatura, para a maioria das espécies de teleósteos que foram estudadas, é que o início da vitelogênese ocorre por aumento da concentração plasmática de E2 que estimula a síntese de vitelogenina (Vtg) no fígado, que é secretada no plasma juntamente com outras lipoproteínas como a VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*, ou seja, lipoproteínas de muita baixa densidade) (Lubzens et al., 2010; Reading et al., 2017). O FSH aumenta a captação de Vtg pelos folículos (Tyler et al., 1991), passando dos capilares da teca para as células da granulosa, chegando à superfície do oócito

através dos canais de poros da membrana e são incorporados por endocitose mediada por receptor, envolvendo receptores específicos nas cavidades das vesículas. As vesículas revestidas movem-se para o ooplasma periférico e fundem-se com os lisossomos formando corpos multivesiculares (Wallace; Selman, 1990; Reading et al., 2017).

Estudos *in vitro* demonstram que tanto o FSH e o LH estimulam a síntese de E2 pelos folículos durante a vitelogênese (Young et al., 2005). No peixe pargo (*Pagrus major*, Perciformes) o LH demonstra ser o principal hormônio atuante na expressão da $P450_{arom}$ e consequentemente na síntese de E2 durante a vitelogênese ao invés do FSH como é amplamente conhecido para a maioria das espécies (Kagawa et al., 2003). Em experimentos *in vitro*, o 11-KT e não o FSH estimula o acúmulo de triglicerídeos nos oócitos na *A. australis* (Lokman et al., 2007). Estas informações reforçam a ideia de que a diversidade de organismos aquáticos reflete na diversidade de funções internas no organismo, e no caso do sistema reprodutivo, o conhecimento das ações dos hormônios hipofisários e dos esteroides gonadais durante o desenvolvimento gonadal ainda se limitam a um número pequeno de espécies.

Após o crescimento do oócito, há a formação do envelope proteico que envolve a célula, mais conhecido como membrana radiata (Modig et al., 2006; 2007), que nos mamíferos é equivalente à zona pelúcida (Lubzens et al., 2010). Os constituintes do folículo nesse momento sofrem modificações, sendo que o espaço entre a membrana plasmática e a granulosa é preenchido por uma matriz extra-oocitária e as células mesenquimais dos ovários se diferenciam em células da teca, formando uma camada celular externa espessa separada das células da granulosa por uma lâmina basal, criando um destacamento dessas camadas (Lubzens et al., 2010). Com o estágio mais avançado do crescimento oocitário, esta célula se prepara estruturalmente para ser fertilizada e um único canal imerge da membrana radiata até o citoplasma, localizado no polo animal, essa estrutura é mais conhecida como micrópila (Lubzens et al., 2010).

Com o término do crescimento do oócito e da vitelogênese, há a retomada da meiose, que até então, havia parado no crescimento primário, saindo da prófase I, permitindo a maturação final do oócito (FOM, do inglês *Final Oocyte Maturation*). Nesse momento, há o aumento agudo nos níveis plasmáticos de LH, aumento da expressão de receptores de LH que estimula a síntese de progestágenos presentes nas células da teca, como o DHP pela enzima 20β-HSD nas células da granulosa (Nagahama; Yamashita, 2008). O 17,20βP ou MIS, que em geral, está presente na

maioria das espécies de teleósteos, e há outro MIS, o 17,20β,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20β, 21-P), encontrado em alguns Perciformes e outras espécies (Young et al., 2005; Nagahama; Yamashita, 2008).

Seja o 17,20βP ou 17,20β, 21-P são oriundos da progesterona, que ao se ligarem a receptores específicos da membrana oocítária ativam o fator promotor da maturação (MPF, do inglês *Maturation Promoting Factor*) no ooplasma, que desencadeia o rompimento da vesícula germinativa e reinicia a meiose (Lubzens et al., 2010). O MIS é importante para induzir o último passo da oogênese, a ovulação. No início da ovulação, o oócito se encontra na metáfase II da meiose, e em seguida o oócito maduro é liberado do folículo até a cavidade ovariana (Patiño et al., 2003).

Já nos Actinopterygiido do sexo masculino, os testículos são órgãos alongados emparelhados que são ligados à parede dorsal do corpo por um mesorquio (Uribe et al., 2014). Morfologicamente, assim como nos demais craniados, os testículos são formados por células germinativas e por células somáticas de Sertoli, que compreendem os compartimentos germinativos e intersticial, separados por uma membrana basal. As células germinativas se diferenciam em gametas masculinos por indução androgênica, resultando em espermatogônias, que se desenvolvem em espermatócitos, espermátides haploides que se diferenciam em espermatozoides (Hughes, 2001; Ross; Capel, 2005; Uribe et al., 2014).

Em geral, os testículos podem ser classificados em: lobular e tubular anastomosado. Nos testículos do tipo lobular o epitélio germinativo localiza-se apenas na periferia do órgão; todavia, nos testículos do tipo tubular anastomosado, os compartimentos germinativos estão interconectados em toda extensão do testículo (Grier, 1993). Dois tipos celulares presentes nos testículos desempenham papéis importantes no ciclo reprodutivo dos craniados, sendo o primeiro as células de Sertoli, cujo abundância no epitélio germinativo determina a capacidade espermatogênica do testículo e também garantem a nutrição e manutenção da germinação espermatogênica (Schulz et al., 2010). Outro tipo celular presente nos testículos é a célula de Leydig, que apresenta função esteroidogênica (Koulish et al., 2002). O arranjo do epitélio germinativo dos testículos nos Actinopterygii pode ser classificado por caráter filogenético e taxonômico, organizado em três tipos (Uribe et al., 2014):

1) testículo tubular, presente em peixes ósseos basais como salmonídeos, ciprinídeos e lepoisteides. Nesse tipo, os túbulos não terminam na periferia dos testículos, mas formam alças na periferia que dobram de volta para os ductos eferentes,

formando uma estrutura altamente ramificada ou túbulos anastomosados, onde eles podem se ramificar e se unir novamente;

2) testículo irrestrito lobular, encontrado em neoteleósteos derivados, exceto Atherinomorpha. Nele, o compartimento germinativo é formado de lóbulos que se estendem para a periferia do testículo, terminando em um ceco;

3) testículo restrito, característico de todos os Atherinomorpha. A restrição das espermatogônias aos terminais dos lóbulos sustenta o caractere monofilético desse grupo (Parenti; Grier, 2004).

No que se refere aos hormônios atuantes no ciclo reprodutivo em machos, eles são os mesmos presentes nas fêmeas e as células de Leydig estão sob regulação dos hormônios FSH e LH. O FSH atua nas atividades das células de Sertoli, como estruturação, nutrição e regulação parácrina das células germinativas (Huhtaniemi; Themmen, 2005). Já o LH regula a produção de esteroides sexuais pelas células de Leydig (Huhtaniemi; Themmen, 2005). O estrógeno é convertido a partir da T nas células de Leydig por ação do FSH, resultando na síntese do E2, que age, mesmo que em baixas concentrações, nas células de Sertoli, permitindo a renovação espermatogonial no início do ciclo juntamente com outras moléculas também reguladas pelo E2 (Miura et al., 1999).

À medida que a espermatogênese procede, a concentração de E2 diminui e os andrógenos T e 11-KT são sintetizados e aumentam suas concentrações plasmáticas, sendo no caso o 11-KT um importante hormônio para iniciar a proliferação e desenvolvimento espermatogonial, decaindo a medida que ocorre a espermiação (Schulz et al., 2010). Antes da espermiação, há um pico de LH, que induz a síntese do MIS (mesmo hormônio já descrito para as fêmeas), que atua na iniciação da meiose no espermatócito, na produção de esperma e na mobilidade espermática (Scott et al., 2010). Além disso, o LH também estimula a síntese de 11-KT, andrógeno relacionado com a maturação e espermiação (Schulz et al., 2010).

Foi possível observar que existe um processo morfofisiológico similar na maturação gonadal dos craniados, e nos Actinopterygii. As mudanças morfofuncionais nas gônadas durante o ciclo ocorrem por modulações internas e externas face às variações ambientais e pela sazonalidade dos fatores abióticos, no caso dos organismos aquáticos a temperatura e o fotoperíodo. Apesar de ser bem conhecido o ciclo reprodutivo de diversas espécies de peixes, muitos Actinopterygii neotropicais carecem de estudo, principalmente em ambiente natural, onde há diversas variáveis muitas vezes

difíceis de mensurar e correlacionar. Entender a relação entre a fisiologia, ambiente e a história de vida dos organismos é um componente particularmente relevante para a compreensão dos processos reprodutivos de peixes marinhos e de água doce (Young et al., 2006). Estudos sobre a biologia reprodutiva dos peixes permitem utilizar os dados obtidos para a avaliação das populações, bem como a conservação e a produção sustentável das espécies (Sun et al., 2013).

Uma das espécies que apresenta a demanda descrita acima é a prejereba (*Lobotes surinamensis*) (Figura 1) pertencente à ordem Perciformes (família Lobotidae) e que está, dentre outras, na preferência alimentar dos caiçaras da Mata Atlântica da região sudeste do Brasil (Hanazaki; Begossi, 2006). *L. surinamensis* ocorre nos oceanos tropicais e subtropicais (Fischer, 1978; Tortonese, 1990), alimentam-se principalmente de crustáceos bentônicos e pequenos peixes (IGFA, 2001). No Atlântico Oeste, essa espécie está distribuída desde Massachusetts (EUA) até o sul da Argentina, incluindo o Golfo do México e o Mar do Caribe (Robins et al., 1986); ocorrendo em baías, estuários (Strelcheck et al., 2004) e em mar aberto, onde pode estar associada a objetos flutuantes (Myers, 1999). Esta espécie foi descrita também no mar Adriático (Dulčić et al., 2014a,b), no mar de Omã (Jawad et al., 2015), no Mediterrâneo (Bilge et al., 2017; De Carlo et al., 2017), nas águas profundas da Tunísia (Shaiek et al., 2018) e no litoral da costa sul do Brasil (Rotundo et al., 2019).

Sabe-se que *L. surinamensis* desova em alto mar (Ditty; Shaw, 1993) e em um dos primeiros estudos conduzidos com esta espécie, Baughman (1941) relatou a presença de fêmeas contendo grandes quantidades de oócitos no Texas de maio até agosto. Em seguida, Merriner; Foster (1974) relataram a presença de machos sexualmente maduros entre junho e agosto e fêmeas neste mesmo estágio reprodutivo foram observadas nos períodos de agosto e setembro. Brown-Peterson; Franks (2001) descreveram os aspectos da biologia reprodutiva da prejereba no norte do Golfo do México, onde observaram que ela apresenta desova parcelada (múltiplas), e a estação reprodutiva seria de junho a agosto, sendo em julho (verão nesta região) o pico da desova. Nesse período, o comprimento dos espécimes que atingiram a primeira maturação foi a partir de 48,5 cm para as fêmeas e 29,0 cm para os machos (Brown-Peterson; Franks, 2001).

Os estudos relacionados à biologia reprodutiva da prejereba são escassos no Atlântico Sul e não há trabalhos caracterizando a fisiologia reprodutiva dessa espécie, o que limita o seu potencial uso na aquicultura ou a conservação desta espécie. Segundo o

FISHBASE (2019) não há informações sobre maturidade e outras variáveis reprodutivas desta espécie, sendo que a maioria dos estudos datam do século passado, sendo os mais recentes limitados aos registros de captura(Bilge et al., 2017; De Carlo et al., 2017; Shaiek et al., 2018; Rotundo et al., 2019).

O presente trabalho teve por objetivo estudar a morfologia e fisiologia reprodutiva de *L. surinamensis* em seu ambiente natural, reunindo informações que permitam trabalhos aplicados na reprodução e conservação desta espécie. Com base no estudo realizado no Hemisfério Norte, nossa hipótese é que a estação reprodutiva da prejereba no Hemisfério Sul ocorre nos períodos mais quentes do ano, de setembro a março (primavera/verão). Adicionalmente, com base no conhecimento da fisiologia reprodutiva de teleósteos, aqui reportado, nossa hipótese é que o uso de ferramentas morfofisiológicas, como a histologia e morfologia gonadal associada à concentração plasmática de esteroides gonadais e expressão gênica das gonadotropinas hipofisárias (FSH e LH) serão válidas para definir o ciclo reprodutivo desta espécie em ambiente natural.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar o ciclo reprodutivo de *Lobotes surinamensis* em seu ambiente natural analisando aspectos morfofisiológicos de machos e fêmeas.

2.2. Objetivos específicos

Utilizar a concentração plasmática de esteroides gonadais assim como a expressão gênica das gonadotropinas hipofisárias como indicadores fisiológicos para caracterizar o ciclo reprodutivo de *L. surinamensis*;

Utilizar a morfologia dos ovários e testículos de *L. surinamensis* para caracterizar o ciclo reprodutivo de *L. surinamensis*.

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção dos animais

Os indivíduos da espécie *L. surinamensis* (Figura 1) foram coletados por pesca de rede de espera e espinhel na Baía da Ilha Grande/RJ, localização S23.10732 WO44.6850 (Figura 2), durante 3 anos. Foram coletadas 9 fêmeas na primavera; 13 no verão; 3 no outono; e 10 no inverno. Já os machos, foram: 21 na primavera; 15 no verão; 5 no outono; e 4 no inverno.

As estações do ano foram delimitadas em: primavera (outubro-novembro-dezembro), verão (janeiro-fevereiro-março), outono (abril-maio-junho) e inverno (julho-agosto-setembro). Os animais foram coletados com o objetivo de observar o grau de desenvolvimento gonadal e o perfil dos hormônios envolvidos na reprodução durante esse período, conforme será detalhado posteriormente.

3.2. Dados biológicos

Os animais capturados foram transferidos para caixas plásticas (200L), posteriormente anestesiados com benzocaína (4g/40L, previamente diluída em etanol), e em seguida foi coletada uma amostra de sangue por punção da vasculatura caudal com seringas e agulhas descartáveis e heparinizadas. O sangue coletado foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm e as amostras de plasma foram acondicionadas em criotubos, inicialmente congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em ultrafreezer -80^{0}C no Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA) (Departamento de Fisiologia - IBUSP) até a data do processamento. Os dados morfométricos como a massa corpórea total (g) e comprimento total (cm) foram registrados.

Após a obtenção dos dados morfométricos, os espécimes foram eutanasiados por secção medular. Foram registradas as massas (g) do fígado e das gônadas para obtenção dos índices hepatossomático (IHS) [IHS=Wf/WtX100; onde Wf, massa do fígado (g) e o Wt é a massa total (g)] e gonadossomático (IGS) [IGS=Wg/WtX100; onde Wg, massa das gônadas (g) e o Wt é a massa total (g)], respectivamente. As hipófises foram

coletadas e acondicionadas em criotubos contendo 500ul de Trizol, que foram inicialmente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em ultrafreezer -80^{0}C no LAMEROA/IB-USP. As gônadas foram coletadas e subamostras foram fixadas em solução de formol a 10% e transferidas após 48h para etanol a 70% até o momento do processamento no LAMEROA/IB-USP.

Todo o procedimento experimental foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IB/USP, protocolo 320).

3.3. Dados de temperatura da água

Os dados de temperatura da superfície do mar (TSM, ou SST do inglês, *Sea Surface Temperature*) foram obtidos a partir do sensor MODIS-Aqua da NASA (do inglês, *National Aeronauticsand Space Administration*) com resolução de 4km da superfície do mar. Foi calculada a média de temperaturas semanais por período de estação nos períodos em que ocorreram as coletas, sendo coletadas as temperaturas noturnas para diminuir o efeito da insolação diária. Os dados foram obtidos da Divisão de Satélites e Sistemas Ambientais (DSA) do Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos (CPTEC) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE).

3.4. Análise histológica das gônadas

No momento da coleta, as gônadas foram retiradas, pesadas e um fragmento foi fixado por 48 horas em formol 10%, transferido para o etanol a 70°GL e processado por métodos rotineiros de histologia. Foram efetuados cortes com 5µm de espessura em micrótomo (LEICA RM2255), e corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para análises morfológicas. As lâminas foram observadas sob microscopia de luz e capturadas para análises de imagens (microscópio LEICA DM1000) acoplado à câmera fotográfica LEICA DFC295 e sistema de captura de imagem LEICA *ApplicationSuite Professional*, LASV3.6). Os estádios de desenvolvimento gonadal e a morfologia associada aos estádios foram classificados de acordo com Brown-Peterson et al. (2011);

1. Desenvolvendo:
   1.1. Fêmea: aumento dos ovários, maior irrigação pelos vasos sanguíneos. Presença de oócitos em crescimento primário, alvéolos corticais e os primeiros estágios

da vitelogênese (Vtg1 e Vtg2). Não há evidencia de oócitos em Vtg3 e folículo pós-ovulatório (POF).

1.2. Macho: testículos pequenos, mas facilmente identificável e espermatocistos visíveis ao longo dos lóbulos testiculares. Espermatogônias, espermatócitos, espermátides e até espermatozoides podem ser identificados, mas os espermatozoides não estão presentes nos ductos espermáticos. O epitélio germinativo ativo por todo os lóbulos.

2. Capaz de desovar/espermiar:

2.1. Fêmea: ovários grandes, vasos sanguíneos dilatados e proeminentes. Oócitos visíveis macroscopicamente. Presença de Vtg3 e POF. Atresia de oócitos vitelogênicos.

2.2. Macho: testículos grandes e firmes. Espermatozoides presentes no lumen dos ductos/lóbulos. Espermatocistos ao longo dos testículos e espermatogênese ativa. O epitélio germinativo pode estar continuo ou descontinuo.

3. Regressão (cessação da desova e espermiação):

3.1. Fêmea: ovários flácidos, vasos sanguíneos proeminentes, oócitos atrésicos e a presença de POFs. Pode ocorrer a presença de alguns oócitos em crescimento primário e secundário.

3.2. Macho: testículos pequenos e flácidos, e sem esperma liberado ao pressionar o testículo. Espermatozoides residuais presentes no lumen dos ductos e lóbulos. Baixa atividade espermatogênica. Proliferação espermatogonial e regeneração de epitélio germinativo na periferia dos testículos.

4. Regeneração (sexualmente maduro, inativo reprodutivamente):

4.1. Fêmea: ovários menores, vasos sanguíneos reduzidos, mas presentes. Apenas oogônias e oócitos em crescimento primário presentes. Parede ovariana espessa, alguns graus de atresia e POFs em degeneração podem estar presentes.

4.2. Macho: Testículos pequenos, geralmente em forma de fio. Sem espermatocistos. O lúmen dos lóbulos pouco existentes. Proliferação espermatogonial ao longo dos testículos. Resíduos de espermatozoides podem ser encontrados no lúmen dos lóbulos.

3.5. Concentração dos esteroides gonadais

As concentrações de E2 e 11-KT foram quantificadas nas fêmeas utilizando kits comerciais de elisaimunoensaio (ELISA) da marca Cayman® e o 17-OHP da marca IBL®. Como não existem informações na literatura sobre a concentração plasmática destes esteroides nesta espécie, foram necessários vários testes de diluição do plasma, para que fosse encontrada a diluição mais adequada que se ajustasse à curva padrão proposta no kit de análise de cada hormônio. Depois dos testes de diferentes diluições, ficou definida para as fêmeas a diluição de 1:2 para a dosagem de E2, e para 11-KT e17-OHP não foi necessária diluição e o plasma foi analisado puro. No plasma dos machos foram quantificados os andrógenos T e 11-KT, também por ELISA, utilizando-se os kits da marca Cayman®. Para a dosagem da T, o plasma foi diluído na proporção de 1:4 e para 11-KT na proporção 1:8. As placas foram analisadas pelo leitor de ELISA (Spectra Max 250, Molecular Devices) em comprimento de onda de 405nm. Cada amostra foi analisada em duplicata para o cálculo do coeficiente de variação intraensaio (CV) e as concentrações apresentadas neste relatório foram apenas aquelas que apresentaram CV abaixo de 20%. Os limites de detecção do ensaio foi de 15 pg/mL para E2, 6 pg/mL para T, 13 pg/mL para 11-KT e para17-OHP de 0,03 ng/mL.

3.6. Distribuição do diâmetro-frequência oocitária, número de oócitos em desenvolvimento (NDO) e cálculo do *batch fecunudity*

A distribuição do diâmetro pela frequência oocitária nos ovários foi calculado a partir razão da média dos diâmetros dos diferentes graus de desenvolvimentodos oócitos [oogônia (OG), PN, Vtg1, Vtg2 e Vtg3] pelo número de oócitos no ovário por estação. O diâmetro oocitário foi calculado no *software* ImageJ 1.52a/Java 1.8.0_172.

A distribuição e o NDO (do inglês *Number of Developing Oocytes*,ou seja, número de oócitos em desenvolvimento) foram estimados estereologicamente pelo *software* STEPanizer© stereology tool, Version beta 2.28 (Tschanz et al., 2011) para realizar as contagens dos oócitos ocupados nos campos com grid com 196 pontos em sub-amostras de 1:4 de 5 fotografias de seções histológicas a partir da mesma amostra, coletada uniformemente aleatória das regiões proximal, medial e distal do ovário. Foram contados apenas os oócitos sob os pontos, dentro de uma malha delimitada no *grid*.

O NDO foi calculado a partir do trabalho de Costa et al. (2016), com oócitos em estágios finais da vitelogênese e que seriam recrutados para o estoque de oócitos na maturação final, os seja, os Vtg2 e Vtg3. O NDO foi estimado aplicando metodologia baseada em modelos seguindo a equação proposta por Weibel et al. (1966) descrito em Emerson et al. (1990) e Murua et al. (2003):

NDO = Ov.$(K/\beta).(Na^{3/2}/Vi^{1/2})$, sendo:

Ov o volume do ovário; K é o coeficiente da distribuição do tamanho do oócito; β é a forma do coeficiente; Na é o número de oócito VTG2/VTG3 transectados por unidade de área; e Vi é a fração do volume ocupado pelo VTG2/VTG3 na seção histológica.

O Ov foi estimado de acordo com Scherle (1970). K foi calculado pela equação proposta por Willams (1977): $K = [M_3/M_1]^{3/2}$, onde o M_1é a média do diâmetro oocitário, i.e. $M_1 = (D_1 + D_2 + D_n)/_n$, e M_3 é o terceiro momento para a média da distribuição do oócito, i.e. $M_3 = [(D_1)^3 + (D_2)^3 + (D_n)^3/n]^{1/3}$; D é diâmetro do oócito individual calculado pela média aritmética do maior (L, *longest*) e do menor (S, *shortest*) diâmetro mensurado na seção histológica (Korta et al., 2010) e n é o número de oócitos VTG2/VTG3 contados. β foi calculado pela razão entre os eixos L e S de cada oócito mensurado nas seções histológicas. Os dados foram logaritimizados (log base 10).

O *batch fecundity* é o número de oócitos produzidos num único lote desovado, e pode ser estimado pela razão do NDO pela massa corpórea (g)sem ovário (Hunter et al., 1985). Os dados de NDO foram logaritimizados (log base 10).

3.7. Expressão gênicadas gonadotropinas hipofisárias (fsh*β* e lh*β*)

As hipófises foram maceradas e o RNA total foi extraído, utilizando-se o reagente *Trizol Reagent* (Invitrogen). O RNA obtido da hipófise foi tratado com DNA-ase (Promega) e realizada uma nova extração do RNA total utilizando-se o reagente *Trizol LS Reagent* (Invitrogen AM2238).Para a obtenção de DNA complementar (cDNA), usou-se 50ng/µL do RNA total, utilizando o *SuperScript III First-Strand Synthesis System* para PCR-real time (Invitrogen, USA).Foram utilizadas sequências já conhecidas dos *primers*da garoupa-verdadeira,*Epinephelus marginatus* (também da ordem Perciformes) (Garcia et al., 2013) para fsh*β* e lh*β*:

Primers-fsh*β*

FSH (forward) - A G T TT C T G G C C A C A G GG T A G
FSH (reverse) - G GG C T G A A C A G A AA G T C T G C

Primers-lh*β*

LH (forward) - G T C A C CC A G T G G A AA C A A C C
LH (reverse) - G T A C G T G C A C A C A T G C T G G T

O *primer* eleito para ser o normalizador foi baseado no mesmo trabalho das sequências do fsh*β* e lh*β*, sendo este o fator de elongação 1α (EF1α) (Garcia et al., 2013):

Primers - ef1α

BMC (forward) - T C G G A G G T A T T G G A A C T G

BMC (reverse) - C C T C A G T G G T C A G G T T G C

BSM (forward) - T G G T A C C T C T C A G G C T G A C

BSM (reverse) - A C C A A G GG T G A A G G C C A G

O cDNA foi amplificado na presença do *SYBERGreen* da QiagenQuantitect e o sistema de PCR quantitativo multiplex Stratagene MX4000 (Stratagene, EUA). A concentração das amostras de cDNA foi 50 ng/mL para fshβ e de 6,25 ng/mL para lhβ. O perfil térmico para PCR em tempo real consistiu de uma etapa de ativação a 95ºC por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95ºC por 30s, o anelamento a 45ºC por 60s e alongamento a 72ºC por 30s. Após o último ciclo de amplificação, a temperatura foi aumentada para 95 ◦C por 1 min e então diminuída para 45ºC para executar 82 ciclos, aumentando em 0,5ºC por ciclo, para obter curvas de fusão, o que confirmou a ausência de curvas inespecíficas. Foi considerada a expressão relativa ao período outono/inverno, pois foi neste período que as análises morfológicas das gônadas sugerem o início da maturação, quando os níveis de expressão seriam os mais baixos.

3.8. Análise estatística

Para analisar possíveis diferenças sazonais dos esteroides gonadais, da expressão gênica das gonadotropinas, fecundidade, dados morfométricos e ambientais foi realizada inicialmente uma análise descritiva e os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média. Em seguida foi analisada a normalidade dos dados utilizando-se o teste Kolmogorov-Smirnov. Como em ambiente natural são previstas maiores variabilidades no padrão dos animais os dados foram analisados ainda pelo teste Grubb's (GraphPad) para verificação de *outliers*. Após a realização destes testes, foi realizada a Análise de Variância (*One-Way* ANOVA), tendo a estação do ano como fator. O nível de significância adotado foi $P \leq 0{,}05$, e as análises foram realizadas com o programa estatístico Sigma Stat® for Windows (versão 3.5).

4. Resultados

Como foi relatado, o número de animais capturados (machos e fêmeas) nas estações do outono e inverno foi baixo. Desta forma foi decidido pela união dos animais coletados nestas duas estações, nas quais a temperatura da água foi mais baixa, como sendo um único grupo experimental.

4.1. Dados morfométricos

As fêmeas de *L. surinamensis* apresentaram o comprimento corpóreo mais elevado na primavera e no verão em relação ao outono/inverno($P=0,011$). Já a massa corpórea das fêmeas não apresentou variações ao longo do ano (P=0,099) (Tabela 1). O IHS não se alterou ao longo ano (P=0,123) e o IGS foi mais baixo no período outono/inverno em relação às demais estações, sendo ainda mais elevado na primavera em relação ao verão (P<0,001). Os machos não apresentaram variações no comprimento total (P=0,077) e massa corpórea (P=0,213) ao longo das estações, no entanto os valores de IHS foram mais elevados na primavera em relação ao verão (P=0,021), enquanto que o IGS também foi mais elevado na primavera, mas em relação ao período outono/inverno (P=0,015) (Tabela 1).

Tabela 1. Dados morfométricos durante o ciclo reprodutivo da prejereba *Lobotes surinamensis* em ambiente natural na Baía de Paraty, Rio de Janeiro. Índice Hepatossomático (IHS) e Índice Gonadossomático (IGS). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre as estações do ano (P<0,05).

	Fêmeas				**Machos**			
	Comprimento (cm)	**Massa (g)**	**IHS**	**IGS**	**Comprimento (cm)**	**Massa (g)**	**IHS**	**IGS**
Primavera	68,78±3,33[a]	7683±1196,7	1,62±0,18	3,57±0,37[a]	48,97±1,96	2723±312,3	1,61±0,11[a]	0,27±0,02[a]
Verão	69,07±1,64[a]	6702±563,6	1,25±0,15	2,33±0,34[b]	52,13±1,33	2854±204,5	1,12±0,07[b]	0,24±0,02[ab]
Out/Inv	59,01±2,83[b]	4686±745,5	1,25±0,08	1,19±0,24[c]	56,33±3,12	3615±503,7	1,36±0,25[ab]	0,13±0,03[b]

Figura 1. *Lobotes surinamensis*. Vista lateral de um indivíduo. Barra: 5 cm.

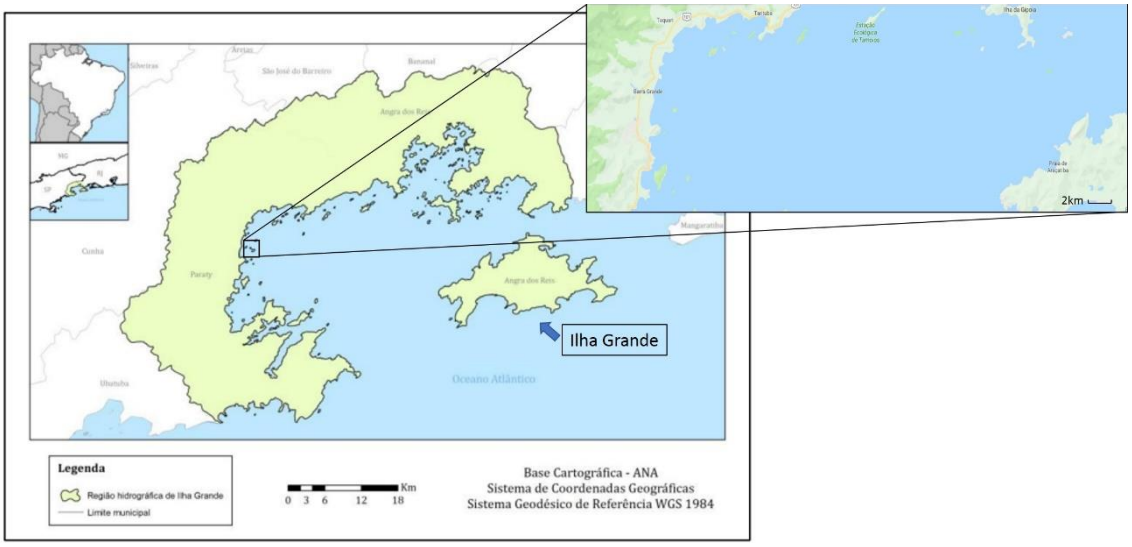

Figura 2. Localização geográfica da Baía da Ilha Grande (Antunes; Peixoto, 2017).

4.2. Dados de temperatura da água

A temperatura média da superfície do mar da primavera foi de 24,93±0,30ºC; no verão foi de 28,19±0,25ºC; no outono foi de 23,85±0,12ºC e no inverno foi de 22,32±0,20ºC (Figura 3).

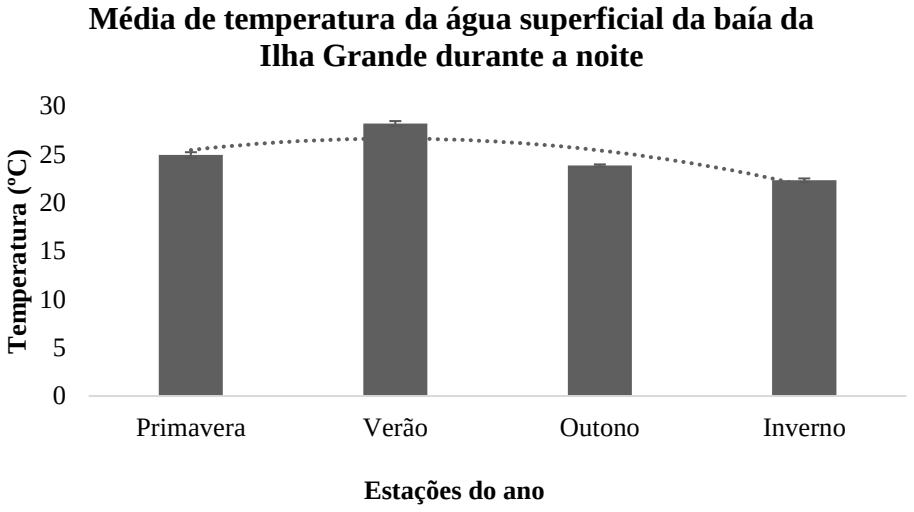

Figura 3. Médias de temperatura superficial oceânica da baía da Ilha Grande durante a noite. Fonte: CPTEC/INPE.

4.3. Dados morfológicos das gônadas

4.3.1. Fêmeas

Os tipos celulares presentes nos ovários durante o ciclo reprodutivo de *L. surinamernsis* foram ninhos de oogônias (Figura 4A), oócitos perinucleolares com nucléolos periféricos acidófilos (Figura 4A), com desenvolvimento primário, oócitos em processo de vitelogênese lipídica inicial, com formação de vesículas cromofóbicas corticais, os alvéolos corticais (Vtg1) (Figura 4B) com deposição de gotículas de lipídio; oócitos vitelogênicos (Vtg2) (Figura 4C) com deposição de vitelo, envolvidos pela membrana vitelina e oócitos com vitelogênese avançada (Vtg3) (Figuras 4C, 4D), já com a membrana vitelina espessa. As células foliculares foram observadas envolvendo os oócitos (Figura 4D).

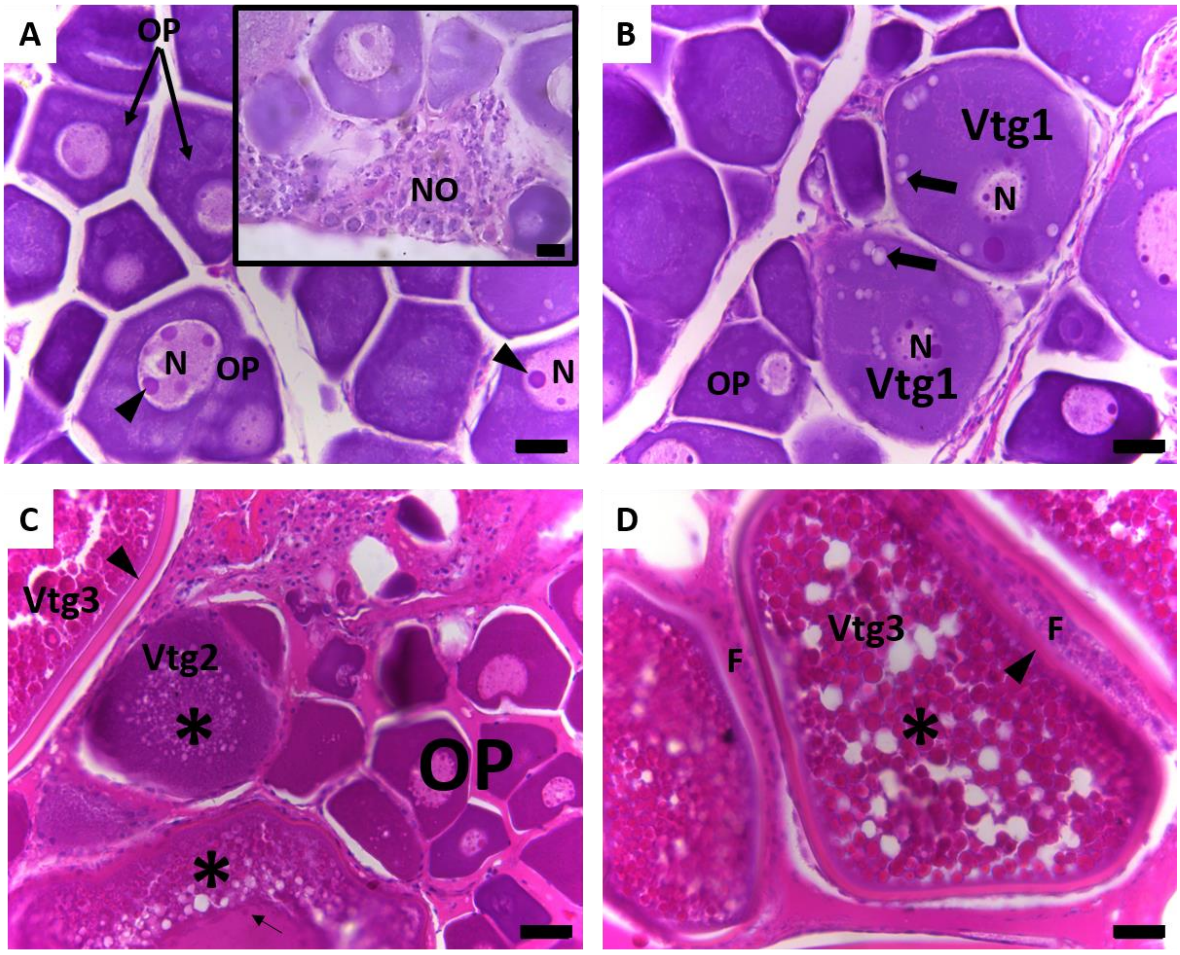

Figura 4. Fotomicrografia dos tipos celulares presentes no ovário durante o ciclo reprodutivo da prejereba *Lobotes surinamensis*. A.: presença de ninho de oogônias (NO) (*inset*), na magnificação do canto superior direito (barra:10µm).Células com citoplasma com maior volume, sendo os oócitos perinucleolares (OP) com núcleo (N) com nucléolos acidófilos periféricos (cabeça de seta). B.: oócitos em processo de vitelogênese lipídica inicial (Vtg1) com formação de alvéolos corticais (seta), núcleo (N), além de oócitos perinucleolares (OP). C.: oócitos em diferentes estágios, desde oócitos perinuclolares (OP), em vitelogênese lipídica com depósito de lipídio (*) (Vtg2) e vitelogênese avançada (Vtg3) já com membrana vitelina espessa (cabeça de seta). Observa-se a presença de nucléolos na periferia do núcleo (seta). D.: oócitos vitelogênicos avançados (Vtg3) com deposição vitelínica (*) envolvidos pela membrana radiata (cabeça de seta) e separados por células foliculares (F). Barra: 25µm.Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE).

4.3.1.1. Primavera

Na estação da primavera, os ovários continham folículos em crescimento secundário e em geral, os oócitos estavam nas fases Vtg2 e Vtg3, nucléolos estavam periféricos e evolvidos pela membrana radiata. Foi também observado, em minoria, folículos em crescimento primário, com a presença de oócitos perinucleolares (Figuras 4A, B e 5A). Os indivíduos foram classificados “em desenvolvimento” e “capazes de desovar”.

4.3.1.2. Verão

No verão, os ovários continham oócitos desenvolvidos e o ooplasma preenchido por gotículas de vitelo, predominantemente em estágio Vtg3, com membrana radiata espessa. Foi observada a presença de folículos em desenvolvimento primário (Figura 5B), com oócitos perinucleolares em baixa frequência. Os indivíduos foram classificados em “capazes de desovar” e “regredindo”.

4.3.1.3. Outono/Inverno

No outono, as fêmeas estavam “regenerando” os seus ovários, sendo os folículos em uma fase de transição entre o desenvolvimento primário para o secundário, com oócitos perinucleolares e ninhos de oogônias distribuídos pelo folículo (Figuras 4A e 5C).

No inverno foram identificadas células em diferentes estágios, sendo os animais classificados como em “desenvolvendo”, ainda que primário, com ninhos de oogônias e oócitos perinucleolares (Figuras 4Ae 5D).

Em ambas as estações, os ovários estavam revestidos por uma túnica muscular espessa (Figuras 5C, D).

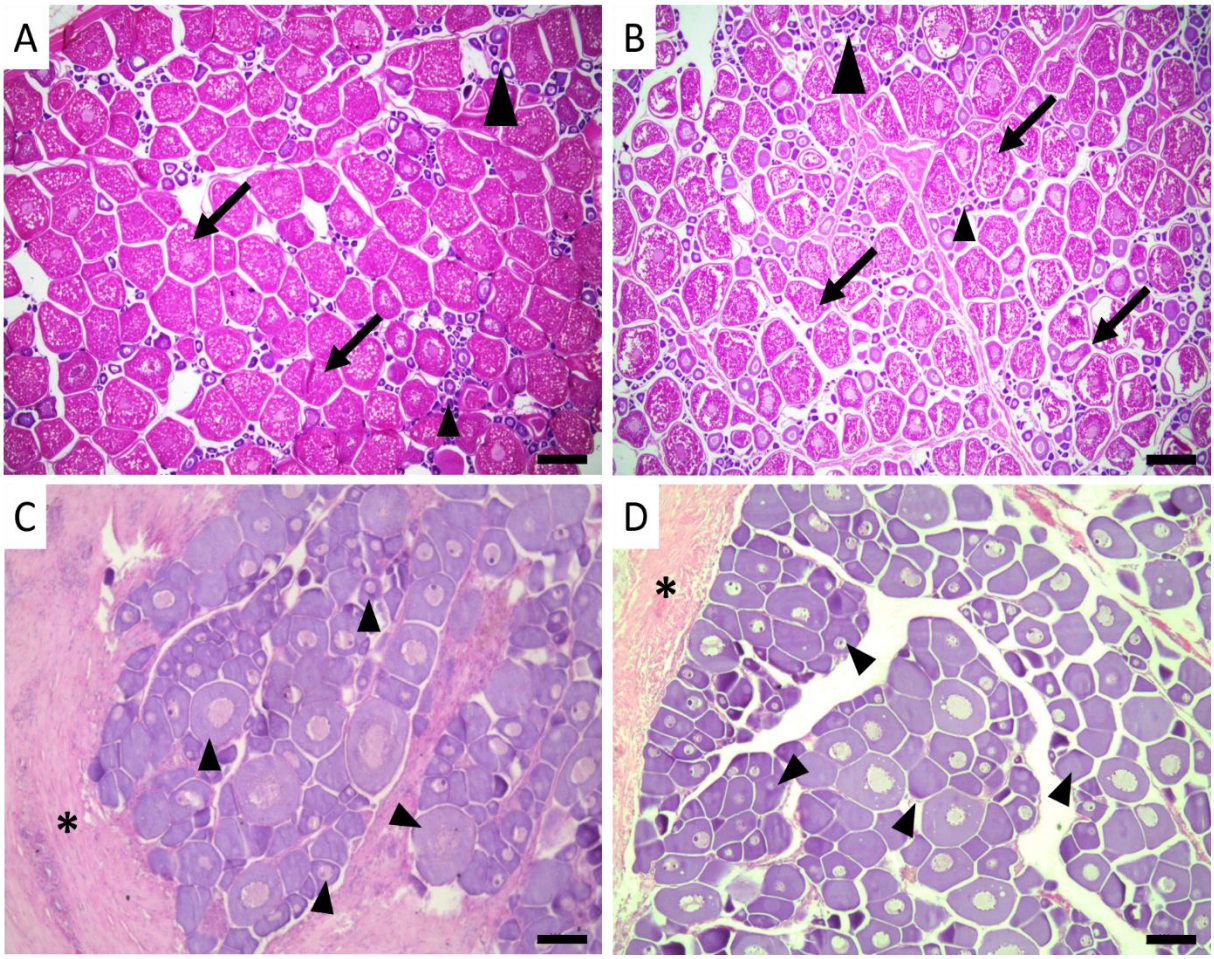

Figura 5. Fotomicrografia dos estádios reprodutivos de fêmeas da prejereba *Lobotes surinamensis* durante as estações do ano. A.: Primavera. Ovário "em desenvolvimento" e "capaz de desovar" com oócitos Vtg3 (seta) e folículos em desenvolvimento primário (cabeça de seta). Barra: 400 µm. B.: Verão. Ovário "capaz de desovar" com oócitos Vtg3, folículos em desenvolvimento primário (cabeça de seta). Barra: 100 µm. C.: Outono. Ovário "regenerando"/"desenvolvendo" com oócitos perinucleolares (OP) (cabeça de seta), em desenvolvimento primário. Envolto por túnica muscular espessa (*). Barra: 100 µm. D.: Ovário "regenerando"/"desenvolvendo" com oócitos perinucleolares (OP) (cabeça de seta), em desenvolvimento primário.Envolto por túnica muscular espessa (*). Barra: 100 µm. Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE).

4.3.2. Machos

O tipo de testículo presente nos machos de *L. surinamernsis* foi do tipo irrestrito lobular (Figura 6A). Os tipos celulares presentes nos testículos durante o ciclo reprodutivo de *L. surinamernsis* variaram dentre os estágios de desenvolvimento, desde os mais iniciais até os mais avançados: cistos de espermatogônias (Figuras 6B,C), com os núcleos com a cromatina condensada e grandes e com volume citoplasmático maior; espermatócitos (Figuras 6B, C), formando cistos, com o núcleo condensado e diminuição do volume citoplasmático (Figuras 6B, C); espermátides, em cistos, com o núcleo e o citoplasma em menor volume (Figuras 6B, C); e espermatozoides (Figura C) preenchendo o lúmen. Essas células estiveram presentes em quase todas as estações do ano, variando qualitativamente.

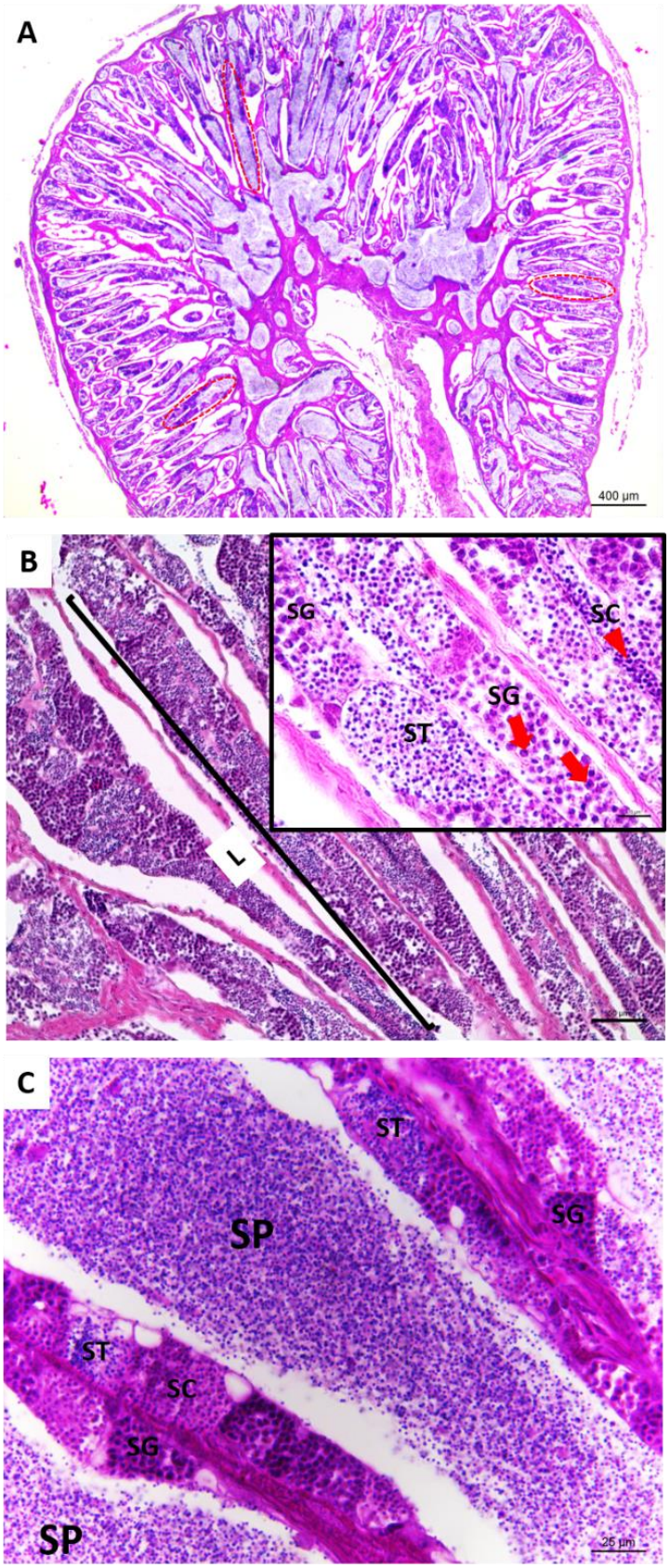

Figura 6. Fotomicrografia dos tipos celulares presentes no testículo durante o ciclo reprodutivo da prejereba *L. surinamensis*. A.: visão geral de um corte testicular,

evidenciando os lóbulos (pontilhado vermelho) do testículo do tipo irrestrito lobular. Barra: 400 µm. B.: lóbulo (L) contendo diferentes estádios de desenvolvimento de células germinativas. Barra: 50 µm. Magnificação do lóbulo (*insight*), destacando a presença de espermatogônias (SG) indicado por setas; espermatócitos (SC) indicados pela cabeça de seta e espermátides (ST). Barra: 10 µm. C.: testículo com túbulos contendo espermatozoides (SP) no lúmen; espermátides (ST) e espermatócitos (SC) em cistos; e espermatogônias (SG). Barra: 25 µm. Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE).

4.3.2.1. Primavera

Durante a estação da primavera, os testículos estavam "em desenvolvimento" e "capazes de espermiar", com o lúmen dos ductos espermáticos preenchidos por espermatozoides, e alguns indivíduos com cistos de espermatogônias nas paredes dos ductos (Figura 7A).

4.3.2.2. Verão

Os indivíduos foram classificados em "capazes de espermiar" e em "regressão", com o lúmen dos ductos espermáticos preenchidos e com remanescentes de espermatozoides. A parede dos túbulos continha células em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 7B).

4.3.2.3. Outono/Inverno

No outono, os indivíduos aparentavam estar "em regeneração", com as paredes dos ductos espermáticos com diversos cistos de espermatogônias (Figura 7C).

No inverno, os indivíduos estavam se "desenvolvendo", com cistos de espermatogônias e presença de espermátides na parede do lúmen dos ductos espermáticos (Figura 7D).

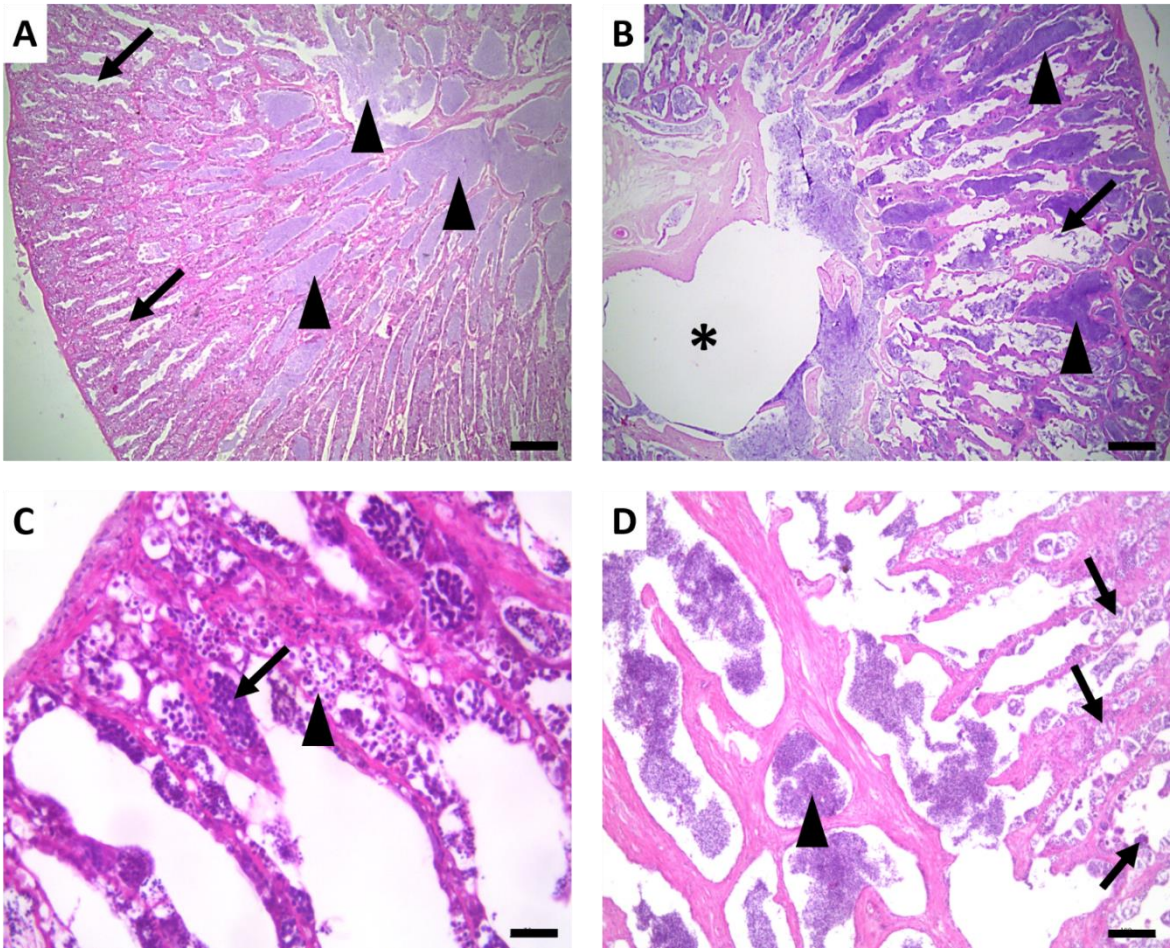

Figura 7. Fotomicrografia dos estádios reprodutivos de machos da prejereba *Lobotes surinamensis* durante as estações do ano. A.: Primavera. Testículo com "desenvolvimento" e "capaz de espermiar" com espermatozoides (cabeça de seta) nos ductos espermáticos mais internos e células germinativas em diferentes estágios (seta) a periferia do testículo. Barra: 400 µm. B.: Verão. Indivíduos "capazes de espermiar" e "regredindo", com ductos espermáticos contendo espermatozoides (cabeça de seta) e ductos espermáticos com resquícios de espermatozoides (seta). Pode-se observar o ducto espermático principal (*). Barra: 400 µm. C.: Outono. Testículo "em regeneração" com a presença de espermatócitos (seta) e espermátides (cabeça de seta), ambas em cisto. Barra: 25 µm. D.: Inverno. Testículo "em desenvolvimento", com ductos espermáticos contendo espermatozoides (cabeça de seta) e células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento (seta). Barra: 100 µm. Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE).

4.4. Perfil dos esteroides sexuais

Considerando-se que mesmo após todos os esforços de pesca, o número de animais (machos e fêmeas) coletados nos meses de temperatura mais baixa (outono e inverno) foi reduzido, optou-se por agrupar os dados destas estações, caso contrário não seria possível aplicar testes estatísticos com a robustez necessária.

4.4.1. Fêmeas

4.4.1.1. 17β-Estradiol (E2)

Na primavera, a concentração plasmática média de E2 foi de 134,77±23,85pg/mL, valor estatisticamente mais elevado (P<0,001) do que a concentração observada no verão,que foi de 63,37±5,78pg/mL e no período outono/inverno de 41,71±8,26 (Figura 8).

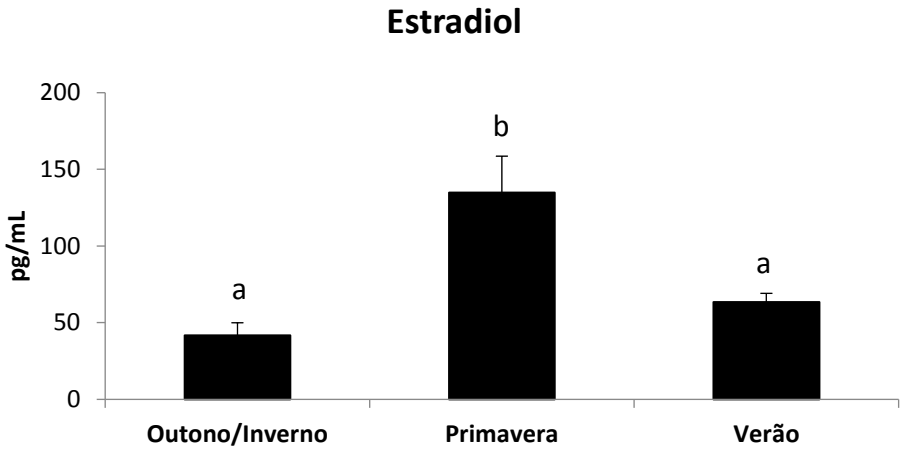

Figura 8. Concentração plasmática (pg/mL) de 17β-Estradiol (E2) durante o ciclo reprodutivo anual das fêmeas da prejereba *Lobotes surinamensis* em ambiente natural na Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro. [ab]Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as estações (P<0,001).

4.4.1.2. 11-cetotestosterona (11-KT)

Na primavera, a concentração plasmática média de 11-KT foi de 8,12±2,57pg/mL, no verão foi de 13,21±4,37pg/mL e no período outono/inverno foi de 28,37±8,54pg/mL. Não houve diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de 11-KT em fêmeas comparando-se as estações do ano (P=0,143) (Figura 9).

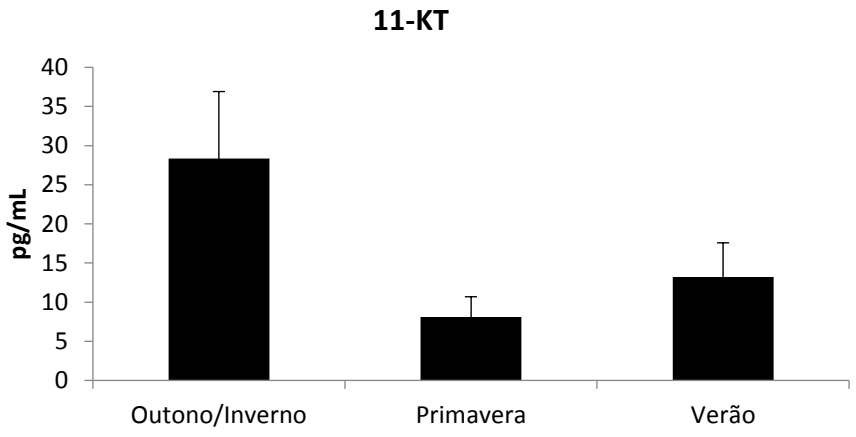

Figura 9. Concentração plasmática (pg/mL) de 11-cetotestosterona (11-KT) durante o ciclo reprodutivo anual das fêmeas da prejereba *Lobotes surinamensis* em ambiente natural na Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro (*P*=0,143).

4.4.1.3. 17-hidroxiprogesterona (17-OHP)

Na primavera, a concentração plasmática média de 17-OHP foi de 0,116±0,0398ng/mL, no verão foi de 0,133±0,0374ng/mL e no período outono/inverno foi de 0,0767±0,0144ng/mL. Não houve diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de 17-OHP em fêmeas comparando-se as estações do ano (P=0,384) (Figura 10).

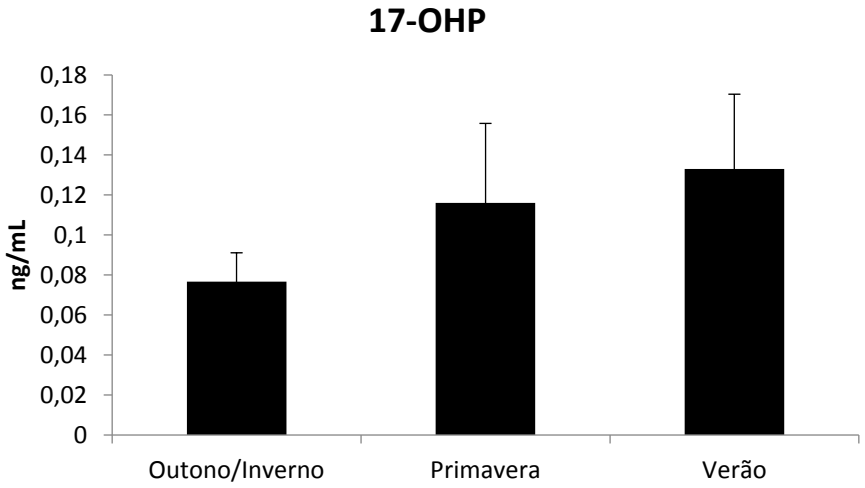

Figura 10. Concentração plasmática (ng/mL) de 17-hidroxiprogesterona (17OHP) durante o ciclo reprodutivo anual das fêmeas da prejereba *Lobotes surinamensis* em ambiente natural na Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro (*P*=0,384).

4.4.2. Machos

4.4.2.1. Testosterona (T)

A concentração plasmática de T foi de 37,52±9,059pg/mLna primavera, 20,02±3,92pg/mL, no verão e 21,77±9,29pg/mLno período outono/inverno. Não houve diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de T em machos entre as diferentes estações (*P*=0,213) (Figura 11).

4.4.2.2. 11-cetotestosterona (11-KT)

Na primavera, a concentração plasmática média de 11-KT foi de 28,97±5,26pg/mL, no verão foi de 20,019±3,92pg/mL e no período outono/inverno, a média plasmática foi de 4,15±2,098pg/mL. A análise estatística demonstrou que a concentração plasmática de 11-KT na primavera foi mais elevada que no período outono/inverno (*P*=0,022) (Figura 11).

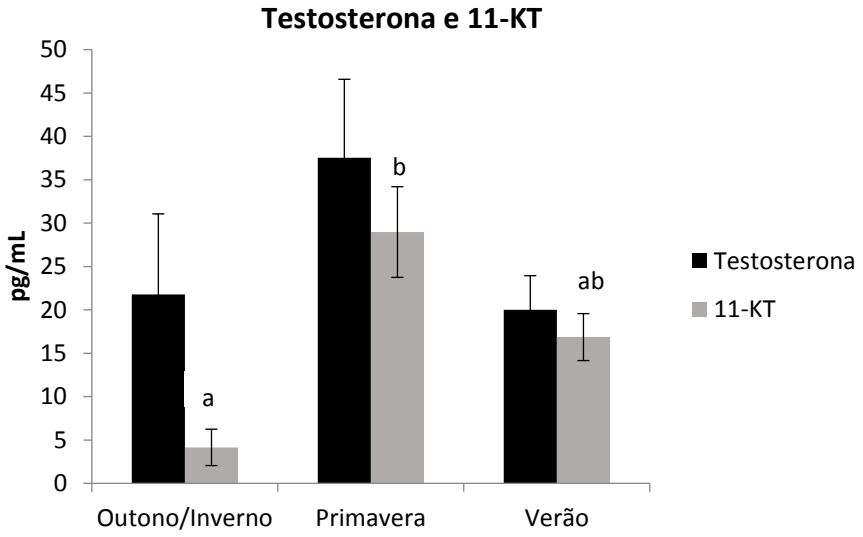

Figura 11. Concentração plasmática (pg/mL) de testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT) durante o ciclo reprodutivo anual de machos da prejereba *Lobotes surinamensis* em ambiente natural na Baía de Paraty, Rio de Janeiro. [ab]Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as estações para cada hormônio (*P*=0,213 para T e *P*=0,022 para 11KT).

4.5. Distribuição do diâmetro-frequência oocitária, número de oócitos em desenvolvimento (NDO) e cálculo do batch fecunudity

A frequência da distribuição do diâmetro oocitário por estação apresentou diferentes porcentagens dos tipos de desenvolvimento oocitário durante o ciclo reprodutivo, sendo os oócitos Vtg2 e Vtg3 a maioria nas estações de primavera e verão e enquanto que os OG e PN foram a maioria nas estações de outono e inverno (Figura 12)

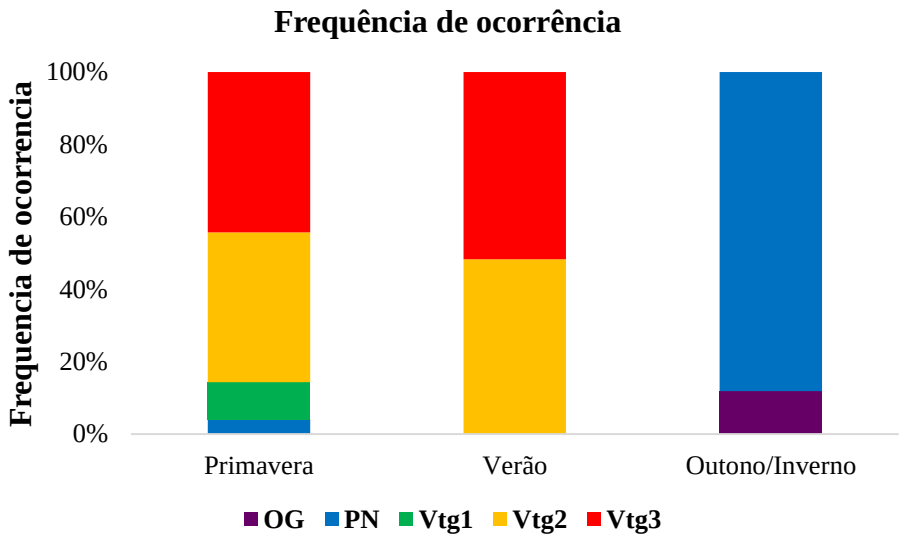

Figura 12. Frequência de ocorrência (%) dos diferentes estádios de desenvolvimento oocitário de *L. surinamensis*durante as estações do ano em ambiente natural. Oogônias (OG), perinucleolares (PN), vitelogênese 1 (Vtg1), vitelogênese 2 (Vtg2) e vitelogênese 3 (Vtg3).

A média logarítmica do número de oócitos (NDO) capazes de desovar na primavera foi de 8,44±0,11 e 7,06±0,32 no verão. Não houve diferenças significativas entre as estações (*P*=0,151) (Figura 13).

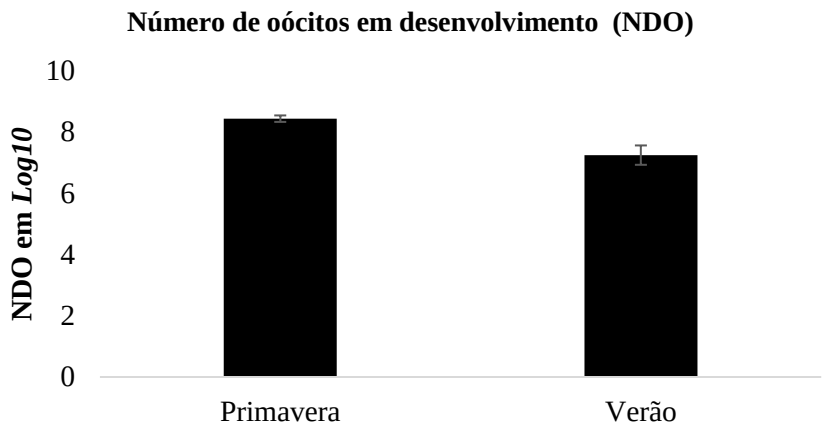

Figura 13. Número de oócitos em desenvolvimento (NDO) em fêmeas de *Lobotes surinamensis* com vitelogênese avançada nas estações de primavera e verão na baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro (P=0,151).

A *batch fecundity* na primavera e no verão tiveram aumento proporcional na razão do NDO pela massa corpórea sem o ovário (Figuras 14 e 15).

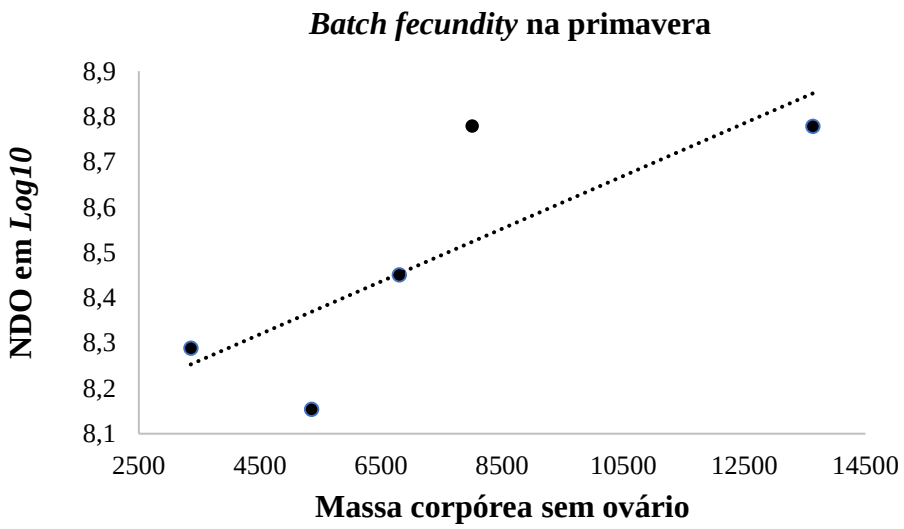

Figura 14. *Batch fecundity* em fêmeas de *L. surinamensis* em ambiente natural na primavera**.**Massa corpórea em gramas.

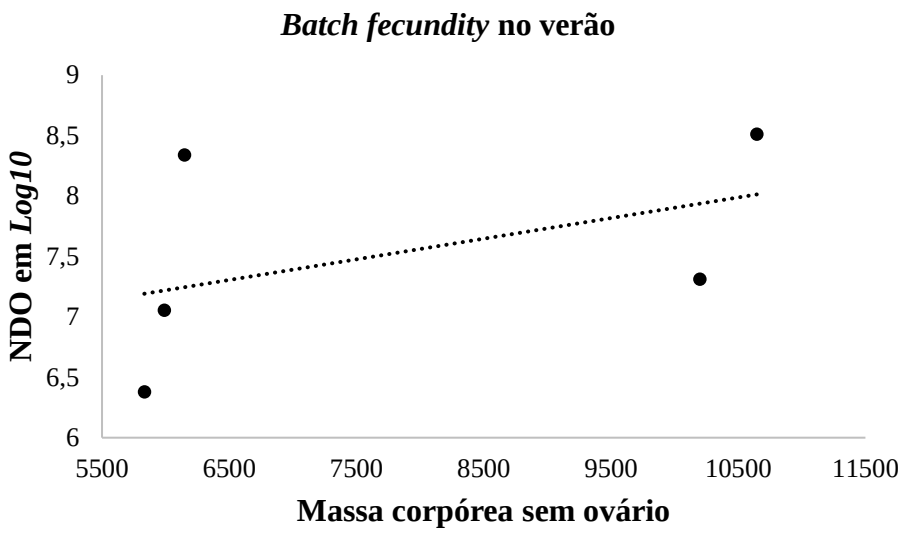

Figura 15. *Batch fecundity* em fêmeas de *L. surinamensis* em ambiente natural no verão**.**Massa corpórea em gramas.

4.6. Avaliação da expressão gênica do fsh*β* e lh*β* hipofisário

Os níveis de expressão de fsh*β* em fêmeas (normalizado pelo gene ef1α) foram de 19,70±0,90 (outono/inverno), 18,18±0,85 (primavera) e 17,89±1,02 (verão) e não diferiram ao longo do ciclo reprodutivo(*P*=0,334). Em machos os níveis de expressão de fsh*β* foram de 19,06±1,57 (outono/inverno), 18,31±0,79 (primavera) e 18,38±0,65 (verão) e também não diferiram ao longo do ciclo reprodutivo (*P*=0,901) (Figura 16).

Os níveis de expressão de lh*β* em fêmeas (normalizado pelo gene ef1α) foram de 1,20 x 10^{-3}±0,236x 10^{-3} (outono/inverno), 2,49 x 10^{-3}±0,436x 10^{-3} (primavera) e 2,61x 10^{-3}±0,558x 10^{-3} (verão) sendo que os níveis de expressão na primavera e no verão foram mais elevados que no outono/inverno (*P*=0,027). Em machos os níveis de expressão de lh*β* foram de 6,8x 10^{-4}±1,18x 10^{-4} (outono/inverno), 19,8x 10^{-4}±3,75x 10^{-4} (primavera) e 27,0x 10^{-4}±2,80x 10^{-4} (verão) e assim como nas fêmeas foram mais elevados na primavera e no verão em relação ao período outono/inverno (*P*=0,011) (Figura 17).

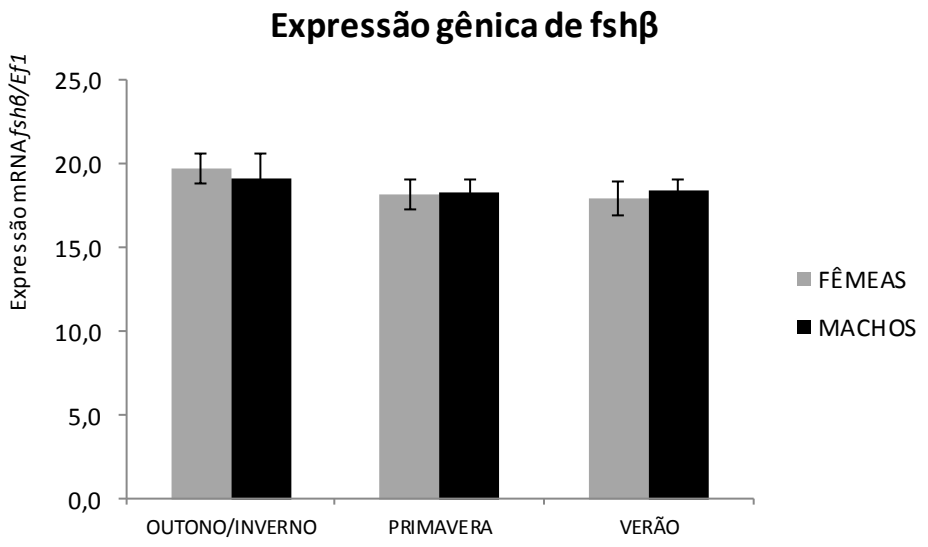

Figura 16. Expressão genica do fsh*β* hipofisário de *Lobotes surinamensis* durante o ciclo reprodutivo em ambiente natural. Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro (*P*= 0,334 nas fêmeas e *P*=0,901 nos machos).

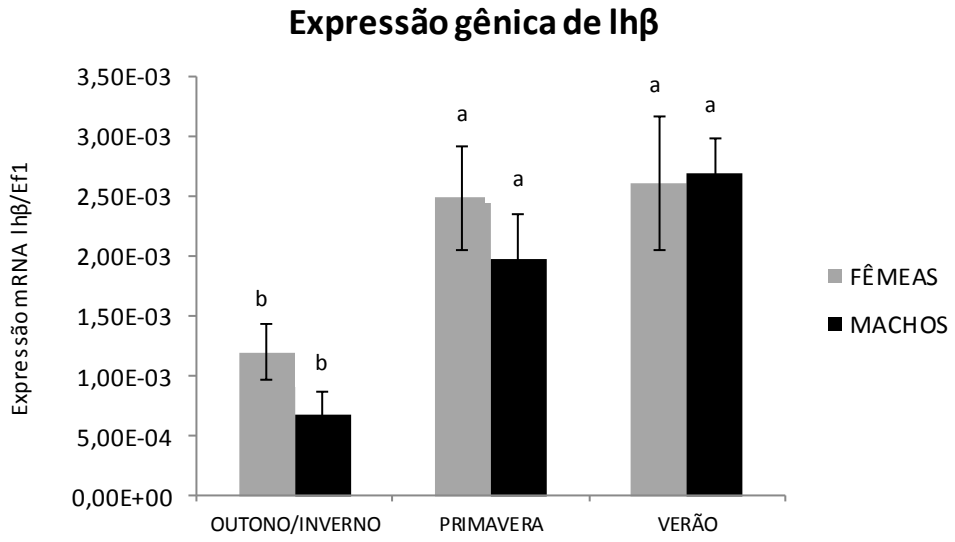

Figura 17. Expressão genica do lh*β* hipofisário de *Lobotes surinamensis* durante o ciclo reprodutivo em ambiente natural. Baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro.[ab]Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as estações para em cada sexo (P = 0,027 nas fêmeas e P= 0,011 nos machos).

5. Discussão

O presente estudo foi realizado na Baía da Ilha Grande, onde o principal terminal pesqueiro artesanal dessa região localiza-se na comunidade de Praia Grande (S23° 9' 6'' S e 44° 41' 51''O) na cidade de Paraty, Rio de Janeiro. A Baía de Ilha Grande é totalmente cercada por uma costa rochosa e numerosas ilhas (Dillenburg; Hesp, 2009). Durante o atual estudo, a temperatura superficial da água(noturna) da Baía da Ilha Grande durante as estações do ano caracteriza a região como clima tropical semiúmido marinho, sendo que na costa do Rio de Janeiro, a temperatura média anual é de 24ºC, com verões quentes com temperaturas que chegam a 40°C (Dillenburg; Hesp, 2009).

Ressalta-se que na Baía da Ilha Grande foram estabelecidas 11 áreas protegidas, das quais a Estação Ecológica dos Tamoios (ESEC Tamoios) contém a maior área marinha sob proteção integral. Os pescadores da comunidade de Praia Grande e entorno de Paraty têm a renda primariamente de origem da pesca e em segundo lugar o turismo (Nora et al., 2017).No trabalho de Nora et al. (2017), segundo os pescadores, a prejereba (*L. surinamensis*) teve um declínio populacional e a principal justificativa apontada pela comunidade foi pelo aumento no esforço de pesca, porém, os pescadores ainda não reconhecem que há necessidade de proteção da espécie. Durante nossas coletas, observamos que a população de *L. surinamensis* tem uma oscilação temporal, pois nas estações de primavera e verão, a captura desta espécie na Baía é substancialmente maior do que no outono e inverno. As estações com temperaturas menos elevadas exigiram maior esforço de captura para fechar um número suficiente de animais.

Os dados morfométricos mostraram que as fêmeas capturadas nas estações de primavera e verão foram maiores que aquelas coletadas na estação do outono/inverno, mas a massa corpórea não se alterou. O comprimento dos animais foi superior aos encontrados na população de *L. surinamensis* presentes no norte do Golfo do México, onde as menores fêmeas adultas em maturação capturada foram a partir de 42,6 cm e as maiores e com estágio avançado de maturação foi de 57,5 cm (Brown-Peterson; Franks, 2001).

O IGS das fêmeas na primavera foi significantemente elevado em relação ao período outono/inverno e ao verão, sugerindo que a primavera seja a estação na qual os ovários

atinjam o tamanho máximo de desenvolvimento, corroborando os dados observados por Brown-Peterson; Franks (2001) no Golfo do México, onde o IGS elevou-se a partir de maio (primavera no hemisfério norte), tendo o pico em julho, decaindo em agosto e se estabilizando. Outras espécies marinhas apresentam também um aumento de IGS nos períodos mais quentes do ano, como a garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*) (Andrade et al., 2003), o pargo (*Pagrus pagrus*) (Militelli et al., 2017),o peixe enxada (*Chaetodipterus faber*) (Soeth et al., 2019), entre outras espécies subtropicais.

Além do IGS, o IHS também pode ser utilizado como um índice para sugerir a mobilização de substratos energéticos em peixes, principalmente nas fêmeas que apresentam grande mobilização de lipídios e proteínas entre o fígado e ovários durante a maturação ovariana (Reading et al., 2017). No entanto, em *L. surinamensis* os valores de IHS não se alteraram ao longo das estações. Aparentemente, há uma relação positiva com o aumento do IGS e do IHS com a mudança da temperatura da água. Na enguia japonesa (*Anguilla japonica*), uma espécie catádroma, animais expostos às temperaturas mais elevadas, manipuladas em cativeiro, apresentaram aumento do IGS em relação àqueles animais mantidos em temperaturas mais baixas (Sato et al., 2006). Esta relação vem normalmente associada à demanda energética da reprodução. Os peixes são ectotérmicos (Fry, 1967), ou seja, a regulação da temperatura corporal se dá a partir de uma fonte de calor externa ao corpo do animal, neste caso, a água. O aumento da temperatura da superfície oceânica a partir da primavera pode ativar processos que são modulados pela temperatura, como a reprodução. Em um estudo realizado com o bonito (*Katsuwonus pelamis*) e com o atum-amarelo (*Thunnus albacares*) no oceano Índico ocidental, foi demonstrado que os valores de IGS acompanharam o aumento e o declínio da temperatura (Stéquert et al., 2001).

A análise da morfologia gonadal é uma ferramenta importante para identificar o grau de desenvolvimento dos gametas, contribuindo assim para definir o período reprodutivo dos animais. Nas análises histológicas dos ovários, foi observado que as fêmeas de *L. surinamensis*, na estação do inverno, continham oócitos perinucleolares em sua maioria, e estes começaram a se desenvolver a partir do final de setembro, com o início da primavera se estendendo até final de março, quando se encerra o verão. No verão a maioria dos folículos estava em vitelogênese avançada e com capacidade de desovar. Os dados da temperatura da água sugerem que este fator abiótico possa ser um gatilho para desencadear a fase de vitelogênese, fato corroborado pela concentração

plasmática de E2nas fêmeas, que aumentou na primavera, ou seja, estação que antecede o verão. A principal função do E2 em fêmeas é promover a vitelogênese, através da síntese de vitelogenina hepática (Reading et al., 2017). Os dados em conjunto mostram que na primavera, os ovários atingem o máximo grau de desenvolvimento (maior IGS), maior concentração de E2, preparando estas fêmeas para a desova na estação subsequente (verão).

Alterações na temperatura influenciam os processos reprodutivos em diversas espécies de peixes, via modulação do eixo HHG, principalmente na síntese e liberação de neuro-hormônios hipotalâmicos, como o GnRH que estimula a liberação do FSH e LH hipofisários (Levavi-Sivan et al., 2010; Zohar et al., 2010). À medida que as temperaturas se elevam no verão, a concentração plasmática de E2 diminui o que parece ser uma resposta consistente ao aumento da temperatura nas espécies de peixes estudadas até o momento, cuja reprodução ocorre em períodos de temperaturas elevadas (Pankhurst; King, 2010; Elisio et al, 2012). O E2 regula o eixo H-H-G por *feedback* negativo e positivo, diminuindo a expressão de fsh*β* e aumentando a expressão de lh*β* (Golan et al., 2014). Essa modulação sugere que a maior concentração de E2 plasmático na primavera em *L. surinamensis*, poderia estar atuando na diminuição da síntese do FSH hipofisário, como alça de *feedback* negativo, resultando na diminuição na expressão do fsh*β* no verão, e por consequência, na diminuição da síntese de E2 na granulosa. No presente trabalho não houve alteração dos níveis de expressão de fsh*β* ao longo do ciclo reprodutivo em fêmeas ou em machos. No entanto, os níveis de expressão de lh*β* foram significativamente mais elevados no verão e na primavera, tanto em machos quanto em fêmeas.

A análise dos níveis absolutos de expressão de ambas as gonadotropinas (normalizados pelo gene ef1α) deixam evidentes que os níveis de expressão de fsh*β* foram mais elevado que os níveis de expressão de lh*β*, tanto em machos quanto em fêmeas ao longo do ciclo reprodutivo, o que já foi observado em salmonídeos (Weil et al., 1995; Gomez et al., 1999). Corroborando este resultado Branco et al. (2019) estudando um caracídeo de água doce mostraram que a expressão de lh*β* é mais dependente de sinais hipotalâmicos e/ou gonadais do que o fsh*β*.Estudos anteriores já evidenciaram o papel do LH em estimular a síntese de E2 (Mylonas; Zohar, 2001; Reading et al., 2017), assim como já foram demonstrados os efeitos moduladores do E2 (assim como da T)na expressão de lh*βin vivo* em salmonídeos (Trinh et al., 1986;

Xionget al., 1994; Dickey; Swanson, 2000) e *in vitro* em *Anguilla anguilla* (Huang et al., 1997).

Após o término do crescimento do oócito e da vitelogênese, há a retomada da meiose, e nesse momento, inicia-se a maturação final do folículo. Os níveis de expressão do lh*β* estiveram elevados em *L. surinamensis* na primavera e verão em relação às estações mais frias o que leva à síntese de progestágenos, como o 17-OHP, que não se alterou durante o ciclo reprodutivo provavelmente por não ser o progestágeno ativo em teleósteos, mas sim o precursor do MIS (Nagahama; Yamashita, 2008;Lubzens et al., 2010). Vale destacar que a concentração plasmática do MIS não foi analisada por dois motivos. Em primeiro lugar porque este hormônio é produzido apenas no momento que precede a ovulação, sendo assim difícil encontrar este momento em coletas em ambiente natural. Outro fato relevante é que na maioria dos Perciformes marinhos o MIS vem sendo identificado como sendo o 17,20β, 21-P (Young et al., 2005; Nagahama; Yamashita, 2008) e não existem kits comerciais para a sua análise. Ressalta-se, também, que o precursor do 17,20β, 21-P é o 11-deoxicortisol, oriundo do 17-OHP, ou seja, há um passo a mais da cascata em organismos que sintetizam o 17,20β, 21-P, diferente dos que sintetizam o17,20βP (Tokarz et al., 2015).

As análises histológicas e a frequência do diâmetro oocitário demonstraram que a maioria dos folículos se encontrava em vitelogênese avançada e estruturalmente prontos para desovar nas estações da primavera e verão, com o NDO, ferramenta utilizada para identificar a fecundidade de *L. surinamensis*, igual em ambas as estações. Brown-Peterson; Franks (2001) relataram que *L. surinamensis*, no Golfo do México desova entre junho e agosto do Hemisfério Norte, com o pico em julho, ou seja, elas se reproduzem no verão. Mas diferente do que foi apontando em nosso estudo estes autores concluíram que *L. surinamensis* tem um curto período reprodutivo, somente no verão.

Nos animais estudados no presente trabalho, os indicadores morfofisiológicos indicam que a prejereba inicia o período de desova na primavera, mantendo-se ativa reprodutivamente no verão. E como mostrado na razão NDO/massa corpórea sem ovário, há uma relação positiva com o aumento da massa corpórea com o aumento de NDO que serão desovados. A população de fêmeas estudada nesse trabalho apresentou maiores comprimentos e IGS elevado significativamente na primavera e verão, épocas onde há maior número de oócitos capazes de desovar. Nossos dados são corroborados

pelo estudo inicial de Baughman (1941) que já havia relatado a presença de ovários de *L. surinamensis* repletos de oócitos desenvolvidos entre maio e agosto, período que compreende a transição da primavera para o verão no Hemisfério Norte, local onde este estudo havia sido realizado.

Outro ponto importante observado em nosso estudo é o perfil de 11-KT que foi observado nas fêmeas e que merece destaque. Como já apresentado o 11-KT é um dos principais andrógenos em teleósteos, produzidos nas células de Leydig nos testículos e nas células da teca no folículo ovariano (Schulz et al., 2010) mas também está presente nas gônadas de seres humanos (Imamichi et al., 2016). A concentração plasmática de 11-KT não variou ao longo do ciclo reprodutivo em fêmeas de *L. surinamensis*, no entanto, é destacada a sua tendência a valores mais elevados no período do outono/inverno, exatamente momento no qual a concentração de E2 plasmático é a mais baixa durante o ciclo anual. Apesar de ser um hormônio classicamente descrito como importante nos machos, o papel da 11-KT em fêmeas vem sendo bem caracterizado, e em *L. surinamensis* a concentração plasmática deste andrógeno em fêmeas está muito próxima das concentrações encontradas nos machos. Concentrações elevadas de 11-KT foram identificadas em enguia e esturjão (Lokman et al.,2002), assim como em salmonídeos (Fitzpatrick et al., 1986) sendo observado que na enguia *Anguilla australis*, o 11-KT, promove o crescimento *in vitro* dos oócitos pré-vilelogênicos (Lokman et al., 2007), assim como promove o aumento do tamanho dos oócitos na enguia japonesa (Matsubara et al., 2003; Endo et al., 2011) e salmão (Forsgren; Young, 2012) *in vitro*. Fêmeas do surubim do Paraíba (*Steindachneridion parahybae*) criadas em cativeiros, apresentaram elevações androgênicas, tanto da T quanto do 11-KT no estádio vitelogênicos, indicando uma possível participação no desenvolvimento oocitário (Honji, 2011). O crescimento dos oócitos na fase pré-vitelogênica do folículo é decorrente do aumento da captação de lipídios nesta fase de desenvolvimento (Endo et al., 2011).

Em fêmeas de *L. surinamensis*, as concentrações de 11-KT apresentaram com uma tendência à elevação nos meses do outono/inverno quando os folículos estavam em sua maioria em estágio perinucleolar e pré-vitelogênicos, o que contribui para as evidências do papel deste andrógeno nesta fase de crescimento inicial do folículo. O andrógeno 11-KT não parece promover a síntese de vitelogenina hepática (Lokman et al., 2015), no entanto, a combinação da administração de E2 e 11-KT promove o acúmulo de vitelogenina *in vitro* nos ovários em *A. australis* (Thomson-Laing et al., 2019).

Ao contrário das fêmeas, os machos não apresentaram variações de comprimento ao longo das estações, assim como a massa corpórea se manteve constante. Brown-Peterson; Franks (2001) definiu que os indivíduos machos maduros foram capturados a partir de 29 cm de comprimento, todavia, em nossas coletas, a população de machos maduros de *L. surinamensis*, teve comprimento corpóreo superior ao encontrado na população do Golfo do México. Assim como nas fêmeas, a primavera foi a estação na qual o IGS dos machos foi mais elevado, quando comparado com o período outono/inverno, sendo o mesmo perfil encontrado para o IHS, índice que não apresentou variação nas fêmeas.

Nas estações da primavera e verão, a maioria dos lúmens dos ductos espermáticos de *L. surinamensis* estavam preenchidos por espermatozoides, bem desenvolvidos e capazes de espermiar. Além da presença de células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento. Com relação aos hormônios do eixo hipófise-gônadas analisados, a primavera e o verão corresponderam às estações nas quais a expressão de lhβ estava mais elevada, enquanto o fshβ não se alterou, perfil semelhante ao encontrado nas fêmeas. Sabe-se que o FSH estimula a proliferação espermatogonial das células de *Leydig* e principalmente converte a T em 11-KT (Miura et al., 1991), enquanto o LH está presente em maiores quantidades na fase de maturação final, na regulação da espermiogênese (Schulz et al., 2010). Como relatado, em *L. surinamensis*, durante a primavera e o verão houve aumento na expressão do lhβ hipofisário, enquanto a concentração plasmática de 11-KT se elevou na primavera, mas diminuiu no verão, retornando aos valores inicialmente encontrados no outono/inverno. Ainda no verão, os lúmens testiculares ainda continham espermatozoides, porém alguns apresentaram apenas resquícios de espermatozoides, sugerindo a liberação dos últimos lotes de esperma, com entrada na fase de regressão, ainda no verão, o que pode estar relacionado com a diminuição na concentração plasmática de 11-KT (Schulz et al., 2010).

Nos animais analisados no outono e inverno, observou-se maior presença de células de diferenciação inicial, como espermatogônias e espermátides, sem haver lúmens preenchidos com espermatozoides, sugerindo o início de um novo ciclo. Já no inverno, os testículos começam a se desenvolver, com a presença de células germinativas em diferentes estágios e o lúmen começa a ser preenchidos por espermatozoides. De uma forma geral, assim como para as fêmeas, sugere-se que na primavera já ocorre um aumento na expressão de lhβ, que se mantém elevada no verão, priorizando a síntese de

11-KT nos testículos, que atinge seu pico no período da primavera, mas que mantém os testículos ativos ainda durante o verão. A T não variou ao longo do ciclo reprodutivo dos machos, corroborando os dados da literatura que sugerem que a 11-KT seja um andrógeno mais potente em teleósteos (Schulz et al., 2010).

A análise conjunta dos dados morfofisiológicos com a temperatura da água sugere que o inverno seja o momento propício para iniciar a remodelação gonadal de *L. surinamensis* na Baía da Ilha Grande, assim como nos demais locais onde a prejereba tem preferência em se reproduzir, como regiões costeiras do Golfo do México, Baía da Ilha Grande, e mares rasos no mediterrâneo. No início da primavera, o fenômeno da ressurgência traz águas profundas e frias do Atlântico Sul Central na costa do Rio de Janeiro (Valentin, 2001). Coma entrada de águas profundas e frias, o fenômeno da ressurgência tem um impacto direto na composição das espécies e na estrutura trófica, intensificando o *bloom* de fitoplâncton, aumentando a produtividade primária na costa e dentro das baías, sendo um local fértil para o desenvolvimento da vida, pois há um aumento substancial de organismos que participarão na cadeia trófica (Valentin, 2001). De forma estratégica, as prejerebas provavelmente adentram a Baía com o fluxo de nutrientes trazidos pelo fundo marinho e a intensificação da produtividade primária e recrutamento de espécies que fazem parte da sua dieta. Sabe-se que as áreas rasas de regiões costeiras são consideras berçários da vida marinha (Pearcy; Myers, 1974; Weinstein, 1979). Pelas condições geográficas e físico-químicas, a Baía da Ilha Grande durante a primavera e verão é um local produtivo e de recrutamento larval para *L. surinamensis*.

6. Conclusões

Os dados obtidos nesse trabalho corroboram nossas hipóteses de que as estações mais quentes, como a primavera e o verão (de setembro a março) correspondam ao período reprodutivo de *L. surinamensis* no Hemisfério Sul. Desta forma, a primavera é a estação na qual ocorre o pico reprodutivo da prejereba, que se estende até o verão, quando o número de oócitos vitelogênicos ainda se mantém elevado, e os animais continuam desovando e espermiando, mas já iniciando o processo de regressão gonadal. No outono/inverno, as gônadas estão pouco desenvolvidas, iniciando a retomada do desenvolvimento gonadal no ciclo.

A segunda hipótese formulada também é corroborada, pois o uso de ferramentas morfofisiológicas aplicadas nesse trabalho foi válido para estudar o ciclo reprodutivo de *L. surinamensis*, uma vez que os dados obtidos validam a literatura consultada para definir as características reprodutivas que compõe o ciclo. Sugere-se, ainda, uma participação do 11-KT no crescimento primário dos folículos ovarianos, que na primavera atingem o ponto máximo de desenvolvimento, modulados pela síntese constante de FSH e aumento da síntese de LH, que promove o aumento de E2 nas fêmeas e 11-KT nos machos.

Como todas as coletas foram realizadas *inshore*, a reprodução ocorre dentro da plataforma, diferente do que foi concluído por Brown-Peterson; Franks (2001). Mas a dificuldade de coletas no período outono/inverno sugere que populações de prejerebas adultas podem estar localizadas fora da plataforma continental (*offshore*) quando estão fora do período reprodutivo, ou ainda, que estes animais realmente diminuem intensamente sua atividade no período de temperaturas mais baixas, o que dificulta sua captura.

7. Referências

Andrade, A. B.; Machado, L. F.; Hostim-Silva, M.I; Barreiros, J. P. Reproductive biology of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Braz. Arch. Biol. Technol*.**46**(3), 373-381 (2003).

Antunes, F.; Peixoto, D. F. The socio-spatial production of the water crisis: institutions, social arenas and conflicts in Ilha Grande Bay, RJ. *Braz. Ap. Sci. Rev*. **1**(1), 2-22 (2017).

Baughman, J. L. On the occurrence in the Gulf coast waters of the United States of the triple tail, *Lobotes surinamensis*, with notes on its natural history. *Am. Nat*.**75**, 569–579 (1941).

Bilge, G..; Filiz, H.; Gülşahin, A. Occurrence of *Lobotes surinamensis* (Osteichthyes: Lobotidae) in the Mediterranean: Historical and recent data. *Zool. Middle East*. **63**(1), 43-47 (2017).

Branco, G. S.; Melo, A. G.; Ricci, J. M. B.; Digmayerb, M.; Jesus, L. W. O.; Habibid, H. R.; Nóbrega, R. H. Effects of GnRH and the dual regulatory actions of GnIH in the pituitary explants and brain slices of *Astyanax altiparanae* males. *Gen. Comp. Endocrinol.* **273**, 209-217 (2019).

Brown-Peterson, N. J.; Wyanski, D. M.;Saborido-Rey, F.;Macewicz, B. J.;Lowerre-Barbieri, S. K. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. *Mar. Coast. Fish*.**3**(1), 52-70 (2011).

Brown-Peterson, N., J.; Franks, J. S. Aspects of the reproductive biology of tripletail, *Lobotes surinamensis*, in the Northern Gulf of Mexico. *Proceeding of the 52nd Gulf and Caribbean Fish Inst*.**52**, 596-597 (2001).

Cannon, W. B. Organization for physiological homeostasis. *Physiol. Rev*.**9**(3), 399-431 (1929).

Costa, E. F. S.; Dias, J. F.; Murua, H. Fecundity of fishes inhabiting coastal and estuarine environments in the southwest Atlantic Ocean. *Mar. Biol. Res*.**12**(3), 304–315 (2016).

De Carlo, F., Massaro, A.; Musumeci, C.; Rossetti, I.; Sartor, P.; Ligas, A. A new record of Atlantic tripletail, *Lobotes surinamensis* (Bloch, 1790), in the Ligurian Sea (NW Mediterranean). *J. Appl. Ichthyol*.,**33**(3), 539-541 (2017).

De Wilde, J. Seasonal states and endocrine levels in insects. In:Assenmacher I, Farner DS (eds) *Env. Endocrinol*. 10–19 (1978).

Dickey, J.T.; Swanson, P. Effects of Salmon Gonadotropin-Releasing Hormone on Follicle Stimulating Hormone Secretion and Subunit Gene Expression in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol*. **118**, 436–449 (2000).

Dillenburg, S. R.; Hesp, P. A. Barrier and Beach Ridge Systems of the Rio de Janeiro Coast. In: Geologyand Geomorphologyof Holocene Coastal Barriers of Brazil. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 225-252 (2009).

Ditty, J. G.; Shaw, R. F. Larval development of tripletail, *Lobotes surinamensis* (Pisces: Lobotidae), and their spatial and temporal distribution in the northern Gulf of Mexico. U.S. *Fish. Bull*. **92**, 33–45 (1993).

Dulčić, J.; Dragičević, B.; Antolovic, N.; Sulic-Sprem, J.; Kozul, V.; Grgicevic, R. Additional records of *Lobotes surinamensis*, *Caranx crysos*, *Enchelycore anatina*, and *Lagocephalus sceleratus* (Actinopterygii) in the Adriatic Sea. *Acta Ichtyol. Pisc*. **44**(1), 71-74 (2014a).

Dulčić, J.; Dragičević, B.; Lipej, L.; Štifanić, M. Range extension of tripletail *Lobotes surinamensis* (Lobotidae) in the Adriatic Sea. A northernmost record in the Mediterranean. *Cybium*.**38**(2), 153-154 (2014b).

Elisio, M.; Chalde, T.; Miranda, L. A. Effects of short periods of warm water fluctuations onreproductive endocrine axis of the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) spawning. *Comp. Biochem. Physiol. A***163**, 47–55 (2012).

Emerson, L.S.; Greer, W. M.; Witthames, P. R. A stereological method for estimating fish fecundity. *J. Fish Biol*.**36**, 721–730 (1990).

Endo, T.; Todo, T.; Lokman, P. M.; Kudo, H.; Ijiri; S.; Adachi, S.; Yamauchi, K.Androgens and very low-density lipoprotein are essential for the growth of previtellogenic oocytes from Japanese eel, *Anguilla japonica*, in vitro. *Biol. Reprod*. **84**, 816-825 (2011).

Fischer, W. FAO species identification sheets for fishery purposes. Western Central Atlantic (fishing area 31). Fish and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 1-7 (1978).

FISHBASE. http://www.fishbase.org/summary/1077. Acesso em 05/03/2019.

Fitzpatrick, M. S.; Van Der Kraak, G.; Schreck, C. B. Profiles of plasma sex steroids and gonadotropin in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during final maturation. *Gen. Comp. Endocrinol*. **62**, 437-451 (1986).

Forsgren, K. L.; Young, G.Stage-specific effects of androgens and estradiol-17beta on the development of late primary and early secondary ovarian follicles of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in vitro. *Biol. Reprod*. **87**(3), 1-14 (2012).

Fry, F. J. Responses of vertebrate poikilotherms to temperature. In: Rose A, ed. Thermobiology. Academic Press, New York. (1967).

Garcia, C. E. O.; Araújo, B. C.; Mello, P. H.; Narcizo, A. M.; Rodrigues-Filho, J. A.; Medrado, A. T.; Zampieri, R. A.; Floeter-Winter, L. M.; Moreira, R. G. Involvement of pituitary gonadotropins, gonadal steroids and breeding season in sex change of protogynous dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), induced by a non-steroidal aromatase inhibitor. *Gen. Comp. Endocrinol.***192**, 170–180 (2013).

Golan, M.; Biran, J.; Levavi-Sivan, B.A novel model for development, organization, and function of gonadotropes in fish pituitary. *Front. Endocrinol.***5**(182), 1-12 (2014).

Gomez, J.M.; Weil, C.; Ollitrault, M.; Le Bail, P.Y.; Breton, B.; Le Gac, F. Growth hormone (GH) and gonadotropin α subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.***113**, 413–428 (1999).

Grier, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: Russell, L. D. & Griswold, M. D. The Sertoli cell. *Elsevier Academic Press*. 704-739 (1993).

Grier, H. J. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J. Morphol*. **243**, 265–281 (2000).

Hanazaki, N.; Begossi, A. Catfish And Mullets: The Food Preferences And Taboos Of Caiçaras (Southern Atlantic Forest Coast, Brazil). *Interciencia*. **31**(2), 123-129 (2006).

Honji, R. M. Controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas do surubim do Paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) em relação ao ciclo reprodutivo e à reprodução induzida em cativeiro. Tese obtida para título de doutorado. Link: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41135/tde-18012012-112928/pt-br.php

Horne, J. K.; Schneider, D. C. Analysis of scale-dependent processes with dimensionless ratios. *Oikos*.**70**, 201–211 (1994).

Huang Y. S.; Schmitz, M.; Le Belle, N.; Chang, C. F.; Querat, B.; Dufour, S. Androgens stimulate gonadotropin-II a-subunit in eel pituitary cells in vitro. Mol *Cell Endocrinol*.**131**, 157–166 (1997).

Hughes, I. A. Minireview: sex differentiation. *Endocrinology*. **142**, 3281-3287 (2001).

Huhtaniemi, I.T., Themmen, A.P. Mutations in human gonadotropin and gonadotropin receptor genes. *Endocrine*.**26**, 207–217 (2005).

Hunter, R. Preservation of northern anchovy in formaldehyde solution. In R.Lasker (editor), An egg production method for estimating spawning biomass of pelagicfish: Application to the northern anchovy. *Engmulis monlar*, U.S.Dep. Commer., NOAA Tech. Rep. NMFS 36, 63-65 (1985).

IGFA. Database of IGFA angling records until 2001. IGFA (International Game Fish Association) (2001).

Imamichi, Y.; Yuhki, K.; Orisaka, M.; Kitano, T.; Mukai, K.; Ushikubi, F.; Taniguchi, T.; Umezawa, A.; Miyamoto, K.; Yazawa, T. 11-Ketotestosterone Is a Major Androgen Produced in Human Gonads. *J. Clin. Endocrinol. Metab*.**101**(10), 3582–3591 (2016).

Jawad, L.; Al-Abri, N.; Al-Busaidi, H.; Al-Mamry, J. M. Confirmation of the presence of the Atlantic tripletail, *Lobotes surinamensis* (Bloch, 1790), in the Sea of Oman. *J. Appl. Ichthyol.***31**, 747–748 (2015).

Kagawa, H.; Gen, K.; Okuzawa, K.; Tanaka, H.Effects of luteinizing hormone andfollicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity andP450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*.*Biol.Reprod*. **68**(5), 1562-1568 (2003).

Korta, A.; Murua, H.; Kurita, Y.; Kjesbu, O. S. How are the oocytes recruited in an indeterminate fish? Applicationsof stereological techniques along with advanced packing density theory on European hake (*Merluccius merluccius* L.). *Fish. Res.***104**, 56-63 (2010).

Koulish, S.; Kramer, C. R.; Grier, H. J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *J. Morphol.***254**, 292-311 (2002).

Levavi-Sivan, B.; Bogerd, J.; Mañanós, E.L.; Gómez, A.; Lareyre, J.J. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. Gen. Comp. Endocrinol. **165**, 412-437 (2010).

Lokman, P. M.; George, K. A. N.; Divers, S. L.; Algie, M.; Young, G. 11-Ketotestosterone and IGF-I increase the size ofprevitellogenic oocytes from shortfinnedeel, *Anguilla australis*, in vitro. *Reproduction*.**133**, 955–967 (2007).

Lokman, P.M.; Harris, B.; Kusakabe, M.; Kime, D.E.; Schulz, R.W.; Adachi, S.; Young, G. 11-Oxygenated androgens in female teleosts: prevalence, abundance, and life history implications. *Gen. Comp. Endocrinol*. **129**, 1–12 (2002).

Lokman, P. M.; Wylie, M. J.; Downes, M.; Di Biase, A.; Damsteegt, E. L. Artificial induction of maturation in female silver eels, *Anguilla australis*: The benefits of androgen pre-treatment.**437**(1), 111-119 (2015).

Longhurst, A. Ecological Geography of the sea. *Academic Press*, San Diego, CA,USA (2010).

Lubzens, E.; Young, G.; Bobe, J.; Cerdà, J. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.***165**, 367-389 (2010).

Mann, K.; Lazier, J. Dynamics of Marine Ecosystems: Biological-Physical Interactionsin the Oceans. *Blackwell Publishing Ltd*., Oxford, UK. ISBN: 9781405111188 (2013).

Matsubara, H.; Kazeto, Y.; Ijiri, S.; Hirai, T. Changes in mRNA levels of ovarian steroidogenic enzymes during artificial maturation of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.***69**(5), 979-988 (2003).

Merriner, J. V.; Foster, W. A. Life history aspects of the tripletail, *Lobotes surinamensis* (Chordata, Pisces, Lobotidae), in North Carolina waters. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc*. **90**, 121–124 (1974).

Militelli, M. I.; López, S.; Rodrigues, K. A.; García, S.; Macchi, G. J. Reproductive potential of the red porgy (*Pagrus pagrus*) in coastal waters of Buenos Aires Province (Argentina) and Uruguay (34º-39ºS). *Neotrop. Ichthyol*. **15**(2), e160127 (2017).

Miura, T.; Miura, C.; Ohta, T.; Nader, M. R.; Todo, T.; Yamauchi, K. Estradiol-17βStimulates the Renewal of Spermatogonial Stem Cells in Males. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***264**(1), 230-234 (1999).

Miura, Y.; Kato, H.; Noguchi, T. Effect of dietary proteins on insulin-like growth Factor-1 (IGF-1) messenger ribonucleic acid content in rat liver. *Br. J. Nutr.***67**, 257-265 (1991).

Modig, C.; Babin, P. J.; Cerdà, J.; Lubzens, E. The Fish Oocyte: From Basic Studies toBiotechnological Applications. *Springer*, Dordrecht, 113–139 (2007).

Modig, C.; Modesto, T.; Canario, A.; Cerdà, J.; von Hofsten, J.; Olsson, P.E. Molecular characterization and expression pattern of zona pellucida proteins in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biol. Reprod*. **75**, 717–725 (2006).

Murua, H.; Kraus, G.; Saborido-Rey, F.; Witthames, P. R.; Thorsen, A.; Junquera, S. Procedures to estimate fecundity ofmarine fish species in relation to their reproductive strategies.*J. N. Atl. Fish. Sci.***33**, 33–54 (2003).

Myers, R. F. Micronesian reef fishes: a comprehensive guide to the coral reef fishes of Micronesia, 3rd revised and expanded edition. Coral Graphics, Barrigada, Guam. **330** (1999).

Mylonas, C. C.; Zohar, Y. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: From hormones to genes. *Aquacult.***197**(1):99-136 (2001).

Nagahama, Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.***38**, 217–229 (1994).

Nagahama, Y.; Yamashita, M. Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev. Growth. Diff.***50**, 195–219 (2008).

Nora, F. P. M.; Vinicius Figueiredo Nora, V. F.; Clauzet, M.; Ramires, M.; Begossi, A. The Fishermen from Praia Grande, Paraty, RJ: Resilience Aspects inTheir Socio-Ecological System. *Desenvolv. MeioAmbiente.***40**, 439-457 (2017).

Pankhurst, N. W.; King, H. R. Temperature and salmonid reproduction: implications for aquaculture. *J. Fish Biol.* **76**(1), 68-85 (2010).

Pankhurst, N. W.; Munday, P. L. Effects of climate change on fish reproduction and early life history stages. *Mar. Freshwater Res.***62**, 1015–1026 (2011).

Parenti, L.R.; Grier, H.J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. Integr. *Comp. Biol.***44**, 333–348 (2004).

Patiño, R., Yoshizaki, G., Thomas, P., & Kagawa, H.Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **129**, 427-439 (2001).

Patiño, R.; Sullivan, C.V. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol. Biochem.***26**, 57–70 (2002).

Patiño, R.; Thomas, P.; Yoshizaki, G. Ovarian follicle maturation and ovulation: an integrated perspective. *Fish Phys. Biochem.***28**, 305–308 (2003).

Pearcy, W.G.; Myers, S.S. Larval fishes of Yaquina Bay, Oregon: a nursery ground for marine fishes? *Fish. Bull.US.***72**, 201–213 (1974).

Pörtner, H.O.; Karl, D.; Boyd, P.W.; Cheung, W.W.L.; Lluch-Cota, S.E.; Nojiri, Y.; Schmidt, D.; Zavialov, P. Ocean systems. In: Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (eds Field C. B.; Barros, V. R.; Dokken, D. J.; Mach, K. J.;

Mastrandrea, M. D.;Bilir, T. E.; Chatterjee, M.;Ebi, K. L.; Estrada, Y. O.; Genova, R. C.; Girma, B.; Kissel, E. S.; Levy, A. N.; MacCracken, S.; Mastrandrea, P. R.; White, L. L.).*Cambridge University Press*, Cambridge, UK and New York, NY, USA. 411-484 (2014).

Reading, B. J.; Sullivan, C. V.; Schilling, J. Vitellogenesis in Fishes. In: Reference Module in Life Sciences. Elsevier Inc. 1-12 (2017).

Robins, C.R.; Carleton, R.; Peterson, R. T.; Douglass, J. A Field Guide to Atlantic Coast Fishes, North America. *Houghton Mifflin Company*. **354** (1986).

Ross, A. J.; Capel, B. Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol. Metab*. **16**, 19-25 (2005).

Rotundo, M. M.; Severino-Rodrigues, E; Barrella, W.; Junior, M. P.; Ramires, M. Checklist of marine demersal fishes captured by the pair trawl fisheries in Southern(RJ-SC) Brazil. *Biota Neotrop.* 19(1), e20170432 (2019).

Sato, N.; Kawazoe, I.; Suzuki, Y.; Aida, K. Effects of temperature on vitellogenesis in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci*.**72**, 961–966 (2006).

Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*.**26**, 57–60 (1970).

Schulz, R.W.; de França, L.R.; Lareyre, J.J.; Le Gac, F.; Chiarini-Garcia, H.; Nobrega R.H.; Miura, T. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol*. **165**, 390–411 (2010).

Schulz, R.W.; Miura, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol.Biochem.***26**, 43-56 (2002).

Scott, A.P.; Sumpter, J.P.; Stacey, N. The role of the maturation-inducing steroid, 17,20β-dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. *J. Fish Biol*. **76**, 183–224 (2010).

Selman, S.; Wallace, R.A.; Sarka, A.; Qi, X. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. Morphol.***218**, 203–224 (1993).

Senthilkumaran, B.; Yoshikuni, M.; Nagahama, Y. A shift in steroidogenesisoccurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.***215**, 11-18 (2004).

Shaiek, M.; Jaziri, S.; Amer, I. B. Additional record of the tripletail fish *Lobotes surinamensis* (Bloch, 1790) in the northern Tunisian deep waters (central south Mediterranean). *J. Black Sea/Medit. Environ.***24(**3), 263-271 (2018).

Soeth, M.; Fávaro, L. F.; Spach, H. L.; Daros, F. A.; Woltrich, A. E.; Correia, A. T. Age, growth, and reproductive biology of the Atlantic spadefish *Chaetodipterusfaber* in southern Brazil. *Ichthyol. Res.***66**, 140–154 (2019).

Stéquert, B.; Rodriguez, J. N.; Cuisset, B.; Menn, F. L. Gonadosomatic index andseasonal variations of plasma sex steroids inskipjack tuna (*Katsuwonuspelamis*) and yellowfin tuna (*Thunnusalbacares*)from the western Indian ocean. *Aquat. Living Resour*. **14**, 313−318 (2001).

Strelcheck, A. J.; Jackson, J. B.; Cowan, J. H.; Shipp, R.L. Age, growth, diet, and reproductive biology of the tripletail, Lobotes surinamensis, from the north-central Gulf of Mexico. *Gulf Mex. Sci*. **22**, 45–53 (2004).

Sun, C.L.; Yeh, S.Z. Chang, Y.J.; Chang, H.Y.; Chu, S.L. Reproductive biology of female bigeye tuna *Thunnusobesus* in the western Pacific Ocean. *J. Fish Biol*.**83**, 250-271 (2013).

Thomson-Laing, G.; Damsteegt, E. L.; Nagata, J.; Ijiri, S.; Adachi, S.;Todo, T.; Hiramatsu, N.;Lokman, P. M. Synergistic effects of estradiol and 11-ketotestosterone onvitellogenin physiology in the shortfinned eel (*Anguilla australis*). *Biol. Reprod.*doi: 10.1093/biolre/ioz007 (2019).

Tokarz, J.; Möller, G.; de Angelis, M. H.; Adamski, J. Steroids in teleost fishes: A functional point of view. *Steroids*. **103**, 123-144 (2015).

Tortonese, E. Lobotidae. In J.C. Quero, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post and L. Saldanha (eds.) Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. 2, 780 (1990).

Trinh, K.Y.; Wang, N.C.; Hew, C.; Crim, L.W. Molecular cloning and sequencing of salmon gonadotropin β subunit. *Eur. J. Biochem.***159**, 619–624 (1986).

Tschanz, S. A.; Burri, P. H.; Weibel, E. R. A simple tool for stereological assessment of digital images:the STEPanizer. *J. Microsc.* **243**(1), 47–59 (2011).

Tyler; C.R.; Sumpter, J.P.; Kawauchi, H.; Swanson, P. Involvement of gonadotropins Iand II in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.***84**, 291–299 (1991).

Uribe, M. C.; Grier, H. J.; Mejía-Roa, V. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis.***4**(3), e983400 (2014).

Valentin, J. L. The Cabo Frio upwelling system, Brazil. In: U. Seeliger and B. Kjerfve (eds). Coastal marine ecosystems of Latin America: Ecological studies. Springer, Berlin, 97-105 (2001).

Wallace, R.A., Selman, K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron. Microsc. Tech.***16**, 175–201 (1990).

Weibel, E. R.; Kistler, G. S.; Scherle, W. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell Biol.***30**:23–38 (1966).

Weil, C.; Bougoussa-Houadec, M.; Gallais, C.; Itoh, S; Sekine, S; Valotaire, Y. Preliminary evidence suggesting variations of GtH 1 and GtH 2 mRNA levels at different stages of gonadal development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.***100**, 327–333 (1995).

Weinstein, M.P. Shallow marsh habitats as primary nurseries forfishes and shellfishes, Cape Fear River, North Carolina. *Marine Biology* (Berlin) **58**, 227–243 (1979).

Williams, M. A. Quantitative methods in biology. In: Glauert AM, editor. *Practical Methods in Electron Microscopy*. (1977).

Wingfield, J. C.; Maney, D. L.; Breuner, C. W.; Jacobs, J. D.; Lynn, S.; Ramenofsky, M.; Richardson, R. D. Ecological Bases of Hormone—Behavior Interactions: The "Emergency Life History Stage". *Amer. Zool.***38**(1), 191–206 (1998).

Wingfield, J. C.; Patrick,J. K;Angelier, F.;Chastel, O.; Lei, F.; Lynn, S. E.; Miner, B.; Davis, J. E.; Li, D.; Wang, G. Organism–environment interactions in a changing world: a mechanistic approach. *J. Ornithol.***152** (1), 279–288 (2011).

Xiong, F.; Liu, D.; Le Drean, Y.; Elsholtz, H.P.; Hew, C.L. Differential recruitment of steroid hormone response elements may dictate the expression of the pituitary gonadotropin II beta subunit gene during salmon maturation. *Mol. Endocrinol*. **8**, 782–793 (1994).

Young, G.; Kusakabe, M.; Nakamura, I.; Lokman, P. M.; Goetz, F. W. Gonadal Steroidogenesis in Teleost Fish. In: Hormones and Their Receptors in Fish Reproduction. *Molecular Aspects of Fish & Marine Biology*.**4**,155-223 (2005).

Young, J. L.; Bornik, Z. B.; Marcotte, M. L.; Charlie, K. N.; Wagner, G. N. Hinch, S. G.; Cooke, S. J. Integrating physiology and life history to improve fisheries management and conservation. *Fish Fish*.**7**, 262–283 (2006).

Zhao, Q.; Li, Z. Synthesis of l 1-substitutedandrostenediones and testosterones as human decidual cell growth inhibitors. *Steroids*. **59**, 190-195 (1994).

Zohar, Y.; Muñoz-Cueto, J.A.; Elizur, A.; Kah, O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol*. **165**, 438-455 (2010).