



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

UNIDADE DE CIÊNCIAS EXACTAS E HUMANAS

Ontogenia da cartilagem e do osso em dourada, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758)

Dissertação para obtenção do grau de mestre
Mestrado em Química Celular

Manuel Almeida dos Ramos Faustino

Faro
1996



TESES
SD

Ontogenia da cartilagem e
do osso em dourada,
Sparus aurata - Faustino,



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

UNIDADE DE CIÊNCIAS EXACTAS E HUMANAS

Ontogenia da cartilagem e do osso em dourada,
Sparus aurata (Linnaeus, 1758)

Dissertação para obtenção do grau de mestre
Mestrado em Química Celular

Manuel Almeida dos Ramos Faustino

Faro
1996

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
SERVIÇO DE DOCUMENTAÇÃO

380 T.

20106100	31103
597 FAV + Out	

O conteúdo desta dissertação é da exclusiva responsabilidade do autor.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'M' followed by a series of overlapping loops and lines that form the rest of the name.

(Manuel Almeida dos Ramos Faustino)

Aos meus Pais

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Doutora Deborah Power, que tomou a cargo a orientação científica deste projecto, pelo inquestionável empenho, incentivo e dinamismo demonstrados, bem como pelos valiosos conhecimentos comigo partilhados.

Ao Prof. Doutor Adelino Canário, pelos seus conselhos, sugestões e disponibilidade demonstrada.

Ao Prof. Doutor Winchil Vaz, pela forma amigável com que sempre me apoiou e pelo seu empenhamento pessoal, na resolução de questões institucionais.

Ao Dr. Pedro Pousão, pela cedência dos ovos e pelas facilidades concedidas na utilização dos tanques de cultivo, nas instalações do IPIMAR.

Aos Conselhos Pedagógicos das E. S. Dr. Francisco F. Lopes (Olhão) e E. S. Pinheiro e Rosa (Faro), cujo parecer foi decisivo para a obtenção de equiparação a bolseiro, sem o qual este trabalho teria sido de difícil conclusão.

À Dr^a. Ermelinda Travia, pela revisão e correcção do texto.

Aos Drs. Pedro Guerreiro e Paulo Vília, pela revisão do resumo em inglês.

Aos Dr. João Condeça, Dr^a. Teresa Modesto, Dr^a. Naír Enxerto, Dr. Paulo Vília, Dr. Pedro Guerreiro, Dr^a. Cecília Santos, Dr^a. Sílvia Socorro, Dr^a Jessie Melo e Eng^{as}. Técnicas Regina Ervideira e Elsa Couto, que sempre se mostraram disponíveis para ajudar e pelo excelente ambiente de trabalho proporcionado.

Ao Sabino Teixeira, da BST, pelo seu incondicional apoio informático.

À Linda, pelo incentivo, dedicação e carinho.

À Joana, ao André e ao Alexandre, por terem "compreendido" a pouca disponibilidade do pai.

RESUMO

A dourada (*Sparus aurata* L.) é uma das mais importantes espécies comerciais do sul da Europa, tendo o seu cultivo em cativeiro sido grandemente incrementado, entre nós, na última década. O estudo e caracterização da ontogenia das estruturas que formam o esqueleto, fornece-nos conhecimentos essenciais, para posteriores melhoramentos na produção de larvas e, provavelmente um melhor conhecimento ecológico da espécie.

Ovos e larvas foram colhidos diariamente e fixados numa solução de PFA a 1%. O desenvolvimento condro-ósseo foi observado utilizando-se as técnicas de coloração Alcian blue/Alizarin red e fosfatase alcalina.

Na coluna vertebral, aos 4.1 mm NL, aparece o hipural 1 cartilágneo, numa posição ventral à notocorda. A flexão desta dá-se por volta dos 5.7/6.0 mm SL, em simultâneo com o início da ossificação. Esta ocorre primeiramente no 2º arco neural e 2º *centrum*, continuando no sentido posterior. Por volta dos 7.1 mm SL o 24º *centrum* (uróstilo) ossifica, na altura em que o 14º/15º *centrum* está formado. Cerca dos 9.0 mm SL, a totalidade dos *centra* está formada.

O complexo caudal inicia o seu desenvolvimento com o aparecimento do hipural 1 cartilágneo aos 4.1 mm NL. Os raios principais da barbatana caudal começam a ossificar aos 5.1 mm NL, completando-se a totalidade do conjunto aos 7.0 mm SL. Os uroneurais 1 e 2 formam-se, respectivamente, aos 10.4 e 16.0 mm SL, altura em que todos os elementos do complexo caudal estão ossificados, com excepção das cartilagens acessórias.

As primeiras estruturas a observar-se em cada conjunto barbatana peitoral/cintura escapular, aos 3.1 mm NL, são o *cleitrum* ossificado e uma formação cartilágnea composta pela placa da barbatana e pelo complexo escápula-coracóide. Aos 7.9 mm SL, a placa cartilágnea está dividida em quatro "actinosts" e observam-se doze/treze distais radiais cartilágneos e dez raios moles ossificados. Aos 14.7 mm SL, observam-se todos os quinze raios moles ossificados e todo o conjunto barbatana peitoral/cintura escapular está ossificado, com excepção dos quinze distais radiais.

Relativamente às barbatanas dorsal e anal, aos 6.5-7.0 mm SL, observam-se dorsalmente dez pterigióforos proximais e ventralmente oito pterigióforos proximais, todos cartilágneos. Aos 7.0-7.7 mm SL, é possível distinguir todos os pterigióforos proximais e distais cartilágneos, tanto dorsal como ventralmente e os três pré-dorsais cartilágneos. O início da ossificação dos pterigióforos proximais dorsais e ventrais e dos pterigióforos distais dorsais e ventrais dá-se respectivamente aos 10.4 mm SL e 11.3 mm SL. Os pré-dorsais estão ossificados aos 12.1 mm SL.

Em cada barbatana ventral e respectiva cintura, observa-se o aparecimento do *basipterigium* cartilágneo aos 7.9 mm SL. Os primeiros raios moles iniciam a ossificação aos 9.4 mm SL e aos 11.4 mm SL, a espinha e os cinco raios moles estão ossificados. Aos 14.7 mm SL o *basipterigium* está ossificado.

No nosso estudo, verificou-se que a osteogénese das diferentes estruturas se faz segundo dois modelos diferentes: ossificação acondral e ossificação endocondral.

Constatou-se, ainda, que o processo ontogénico das estruturas do esqueleto, em *S. aurata*, apresenta consideráveis diferenças com o observado em outros teleósteos, embora se reconheçam padrões de condrificação e ossificação muito semelhantes ao verificado em sparídeos, especialmente em *Pagrus major*.

ABSTRACT

The gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) is one of the most important commercial fish in southern Europe. In Portugal the aquaculture production of this species has largely increased during the last decade. The study and ontogenic characterisation of skeleton structures provide essential knowledge for further improvement of larval production and, probably, a better ecological understanding of this species.

Eggs and larvae were collected daily and fixed in a 1% PFA solution. The cartilage-bone development was observed by using Alcian blue/Alizarin red staining and phosphatase alkaline technique.

At 4.1 mm NL, a small cartilage bud (hypural 1) appears in the vertebral column, in a ventral position to the unflexed notochord. At about 5.7/6.0 mm SL ossification begins, simultaneously with the flexion of the notochord. Ossification first occurs at the 2nd neural arch and 2nd *centrum* and proceeds towards the posterior end. At *circa* 7.1 mm SL, the 24th *centrum* (urostyle) ossifies, as well as the 14/15th *centrum*. At about 9.0 mm SL all the *centra* formed.

Caudal complex development starts at 4.1 mm NL, with the appearance of cartilaginous hypural 1. Ossification of the principal rays of caudal fin begins at 5.1 mm NL and is accomplished at 7.0 mm SL. The uroneurals 1 and 2 are formed at 10.4 and 16.0 mm SL, respectively. At the same time all the structures of caudal complex are ossified, with the exception of accessory cartilages.

The first visible structures in pectoral fin-supports, at 3.1 mm NL, are the ossified *cleithrum*, the fin plate and coracoid-scapula cartilages. At 7.9 mm SL the cartilaginous plate is divided in four actinosts and is possible to see twelve to thirteen cartilaginous distal radials and ten ossified fin rays. At 14.7 mm SL is possible to observe all the fifteen ossified fin rays and all pectoral fin-supports are ossified, with the exception of the fifteen distal radials.

At about 6.5-7.0 mm SL, is possible to observe ten cartilaginous proximal pterygiophores in dorsal fin-support and eight cartilaginous proximal pterygiophores in anal fin-support. At *circa* 7.0-7.7 mm SL, every proximal and distal cartilaginous pterygiophores in dorsal and anal fin-supports are distinguishable as well as the three cartilaginous predorsals. The ossification of both the proximal and distal dorsal and anal pterygiophores starts, respectively, at 10.4 and 11.3 mm SL. The three predorsals bones are completely ossified at 12.1 mm SL.

In each ventral fin-support, the appearance of cartilaginous *basipterygium* occurs at 7.9 mm SL. The ossification of the first fin rays starts at 9.4 mm SL and, at 11.4 mm SL, the spine and five fin rays are ossified. At 14.7 mm SL, *basipterygium* is ossified.

In our study we observed that osteogenesis follow two different patterns: achondral ossification and endochondral ossification.

We also verified that, in *S. aurata*, the ontogenic formation of skeleton structures shows considerable differences from other teleosts. However, the patterns of chondrification and ossification in this specie are similar to those observed in close related sparids, especially in *Pagrus major*.

RÉSUMÉ

La dorade (*Sparus aurata* L.) est une des plus importantes espèces commerciales du sud de l'Europe. Son élevage s'étant fortement développé, parmi nous, dans la dernière décennie. L'étude et la caractérisation de l'ontogénie des structures qui forment le squelette, nous fournit des données essentielles pour réaliser des progrès significatifs au niveau de la production des larves et avoir une meilleure connaissance écologique de l'espèce.

Journellement, des oeufs et des larves furent cueillis et fixés dans une solution de PFA à 1%. Les techniques de coloration Alcian blue/Alizarin red et phosphatase alcaline ont permis l'observation du développement du cartilage et de l'os.

Le hypurale 1 cartilagineux apparaît sur la colonne vertébrale, aux 4.1 mm NL, dans une position ventrale à la corde dorsale. La flexion de celle-ci se fait aux environs des 5.7/6.0 mm SL, simultanément avec le début de l'ossification qui commence d'abord à la 2^{ème} arche neurale et au 2^{ème} *centrum*, continuant dans le sens postérieur. Vers les 7.1 mm SL, le 24^{ème} *centrum* (urôstile) ossifie, au moment où le 14^{ème}/15^{ème} est formé. Aux environs des 9.0 mm SL, la totalité des *centra* est formée.

Le complexe caudal commence son développement avec l'apparition du hypurale 1 cartilagineux aux 4.1 mm NL. Les principaux rayons de la nageoire caudale commencent leur ossification aux 5.1 mm NL, la totalité de l'ensemble se complète aux 7.0 mm SL. Les uroneuraux 1 et 2 se forment, respectivement, aux 10.4 et 16.0 mm SL, c'est le moment où tous les éléments du complexe caudal sont ossifiés, à l'exception des cartilages accessoires.

Les premières structures observées dans chaque ensemble nageoire pectorale/ceinture scapulaire, aux 3.1 mm NL, sont le *cleithrum* ossifié et une formation cartilagineuse composée par la plaque de la nageoire et par le complexe scapula-coracoïde. Aux 7.9 mm SL, la plaque cartilagineuse est divisée en quatre "actinosts" et on observe douze/treize radiaux distaux cartilagineux et douze rayons mous ossifiés. Aux 14.7 mm SL, on observe tous les quinze rayons mous ossifiés et tout l'ensemble nageoire pectorale/ceinture scapulaire ossifié, à l'exception des quinze radiaux distaux.

En ce qui concerne les nageoires dorsale et anale, aux 6.5-7.0 mm SL, on observe dorsalement dix ptérygophores proximaux et ventralement huit ptérygophores proximaux, tous cartilagineux. Aux 7.0-7.7 mm SL, on distingue tous les ptérygophores proximaux et radiaux cartilagineux, dorsal et ventral, et les trois prédorsales cartilagineuses. Le début de l'ossification des ptérygophores proximaux dorsals et ventrals et des ptérygophores distaux dorsals et ventrals se fait respectivement aux 10.4 mm SL et 11.3 mm SL. Les prédorsales ossifient aux 12.1 mm SL.

Sur chaque nageoire ventrale et sa ceinture, on observe l'apparition du *basipterigium* cartilagineux, aux 7.9 mm SL. Les premiers rayons mous commencent leur ossification aux 9.4 mm SL et aux 11.4 mm SL, l'épine et les cinq rayons mous sont ossifiés. Aux 14.7 mm SL le *basipterigium* est ossifié.

Nous avons vérifié que l'ostéogenèse des différentes structures se fait selon deux modèles différents: l'ossification achondrale et l'ossification endochondrale.

Nous avons également constaté que le procès ontogénique des structures du squelette de *S. aurata*, présente des différences considérables par rapport à d'autres téléostéens, bien qu'on reconnaisse des modèles de chondrification et d'ossification semblables aux sparidés, spécialement le *Pagrus major*.

ÍNDICE

Abreviaturas

I. INTRODUÇÃO	1
II. TECIDOS ESQUELÉTICOS E METABOLISMO DO CÁLCIO	3
2.1 Estruturas do aparelho esquelético e tipos de ossificação	5
2.2. Metabolismo do cálcio e glândulas calcémicas	13
III. CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE	16
3.1. Ecologia e habitat	16
3.2. Distribuição geográfica	16
3.3. Alimentação	17
3.4. Morfologia externa	17
3.5. Organização interna	18
3.5.1. Tracto digestivo e estruturas anexas	18
3.6. Ciclo de vida	23
3.6.1. Maturação e postura	24
3.6.2. Desenvolvimento embrionário e larvar	24
IV. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Dupla coloração <i>whole-mount</i> (cartilagem/osso)	29
a. Generalidades	29
b. Procedimento	29
4.2. Fosfatase alcalina	31
a. Generalidades	31
b. Procedimento	32

V. RESULTADOS	33
5.1. Coluna vertebral	33
5.2. Barbatana caudal e estruturas anexas	41
5.3. Barbatanas peitorais e cintura peitoral (escapular)	43
5.4. Barbatanas dorsal e anal e estruturas de suporte	45
5.5. Barbatanas ventrais (pélvicas) e cintura pélvica	48
VI. DISCUSSÃO	53
VII. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	

Abreviaturas

Ac	cartilagem acessória
AP	fosfatase alcalina
Ca²⁺	ião cálcio
CL	calcitonina
DPH	dia(s) após a eclosão
ENL	comprimento do olho-notocorda (comprimento entre a margem anterior do olho e a extremidade posterior da notocorda)
FL	comprimento furcal (comprimento entre a parte mais anterior do exemplar e a furca da barbatana caudal)
GH	hormona de crescimento, somatotropina
NL	comprimento da notocorda
PFA	paraformaldeído
PRL	prolactina
PTH	hormona paratiróide
PTH-rP	proteína relacionada com a PTH
SL	comprimento standard
STC	staniocalcina
TBST	tampão de Tris salino/Triton X-100
TL	comprimento total (comprimento entre a parte mais anterior do exemplar e a extremidade posterior dos raios da barbatana caudal)
Tris	tris(hidroximetil)aminometano

nota: para "actinost", não se encontrou sinónimo em português, pelo que se decidiu utilizar o termo em inglês.

I. INTRODUÇÃO

A dourada, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), é um dos mais importantes peixes comerciais do sul da Europa. De forma a satisfazer, a cada vez, maior procura para esta espécie, as técnicas de cultivo têm vindo a aperfeiçoar-se através de um maior e melhor conhecimento, tanto no que diz respeito aos períodos de desenvolvimento embrionário e larvar, como ao respectivo regime alimentar.

A compreensão e o conhecimento do desenvolvimento da dourada, uma espécie de alto valor económico para o Algarve, é uma forma de contribuir para o melhoramento da qualidade das larvas e, por conseguinte, das "performances" dos estados posteriores de cultivo.

É sobejamente conhecido que as larvas de teleósteos produzidas em viveiros marinhos de exploração intensiva apresentam, frequentemente, qualidade muito variável. Tais larvas exibem vários defeitos típicos: ausência de bexiga natatória (Paperna, 1978; Chatain e Ounais-Guschmann, 1990), malformações morfológicas e osteológicas (Barahona-Fernandes, 1982; Daoulas *et al.*, 1991; Rodger e Murphy, 1991) e variações na pigmentação do corpo (Gartner, 1986), podendo todos eles afectar directamente o valor final do produto, em virtude de baixos crescimentos e altas taxas de mortalidade.

O esqueleto dos Teleósteos, que é constituído por osso, além de funções de suporte e de protecção, caracteriza-se por ser um importante depósito dos iões cálcio e fosfato, os quais são essenciais em muitos processos bioquímicos, como p. ex. a contracção dos músculos e o armazenamento e libertação de energia (Walker, Jr & Liem, 1994).

Ao longo das últimas décadas, várias publicações têm sido efectuadas sobre o desenvolvimento osteológico de Teleósteos (p. ex. Houde & Potthoff, 1976; Potthoff *et al.*, 1984; Matsuoka, 1985, 1987; Potthoff *et al.*, 1986; Balart, 1990; Huysseune & Sire, 1992; Vandewalle *et al.*, 1992; Fujita, 1994; Monod *et al.*, 1994; Balart, 1995).

Em dourada e relativamente aos aspectos osteológicos, apenas se conhecem os trabalhos de Paperna (1978), Andrades *et al.* (1990) e Chatain & Ounais-Guschmann (1990) sobre malformações do esqueleto axial, de Kiriakos *et al.* (1994) acerca do desenvolvimento da notocorda nos estados iniciais e de Faustino & Power (1996), sobre a influência da tiroxina (T4) no aparecimento das estruturas cartilagíneas e ósseas.

O presente estudo, que foi realizado sobretudo com o intuito de clarificar o processo de desenvolvimento das estruturas do esqueleto, teve como principais objectivos:

- * conhecer a ontogenia da cartilagem e do osso em dourada;
- * caracterizar a composição da coluna vertebral, barbatanas e respectivas estruturas de suporte;
- * examinar e determinar quais os tipos de ossificação existentes em dourada;
- * comparar o que se conhece sobre desenvolvimento osteológico em outros teleósteos e sparídeos.

Por outro lado, o estudo detalhado da ontogenia das estruturas cartilagueas e ósseas fornece-nos conhecimentos essenciais para posteriores melhoramentos na produção de larvas e, provavelmente, um maior conhecimento ecológico da espécie.

II. TECIDOS ESQUELÉTICOS E METABOLISMO DO CÁLCIO

A forma do corpo e o movimento nos peixes é o resultado da interação entre o esqueleto e os músculos. De modo a adaptarem-se à grande diversidade de habitats existentes no mundo aquático, uma variedade de formas emergiu com as correspondentes modificações esqueléticas e musculares.

Bertin (1958), devido à extrema diversidade existente, considera a seguinte classificação para os tecidos esqueléticos dos peixes:

Tecidos acálcicos

- * tecido cordal
- * mesostroma (esqueleto gelatinoso ou hialino)
- * mesênquima
- * pseudocartilagem (tecido condróide ou vesiculoso)
- * cartilagem capsular (cartilagem epitelióide ou parênquimatosa)
- * cartilagem hialina (cartilagem verdadeira)

Tecidos calcificados

- * cartilagem calcificada
- * tecido mixto
- * tecido osteóide
- * tecido ósseo propriamente dito
- * tecido ósseo canaliculado

Entre outras, o esqueleto apresenta funções de suporte e de protecção. Os tecidos esqueléticos calcificados, além de elementos estruturais, funcionam ainda como importantes reservatórios de iões cálcio e fosfato, os quais são essenciais em muitos processos bioquímicos, como p. ex. a contracção dos músculos e o armazenamento e libertação de energia (Walker, Jr & Liem, 1994).

Nos peixes e atendendo à natureza do seu esqueleto, pode considerar-se dois grandes grupos: os Condríctios (tubarões, cações, raias e quimeras) que são caracterizados pela presença de um esqueleto cartilagíneo (embora este esteja muitas vezes calcificado), e os Osteíctios que apresentam um verdadeiro esqueleto interno ósseo.

A cartilagem, que é um tecido conjuntivo especializado, forma-se a partir do mesênquima (fig. 1) e é composto por células (**condrócitos**) e uma **matriz extracelular** (colagénio tipo II, proteoglicanos e glicoproteínas). Os condrócitos, que se encontram em cavidades (lacunas) da matriz, sintetizam e segregam essa mesma matriz. A rodear o tecido cartilagíneo e separando-o dos tecidos

adjacentes encontra-se o pericôndrio (Bertin, 1958; Cormack, 1984; Junqueira *et al.*, 1995).

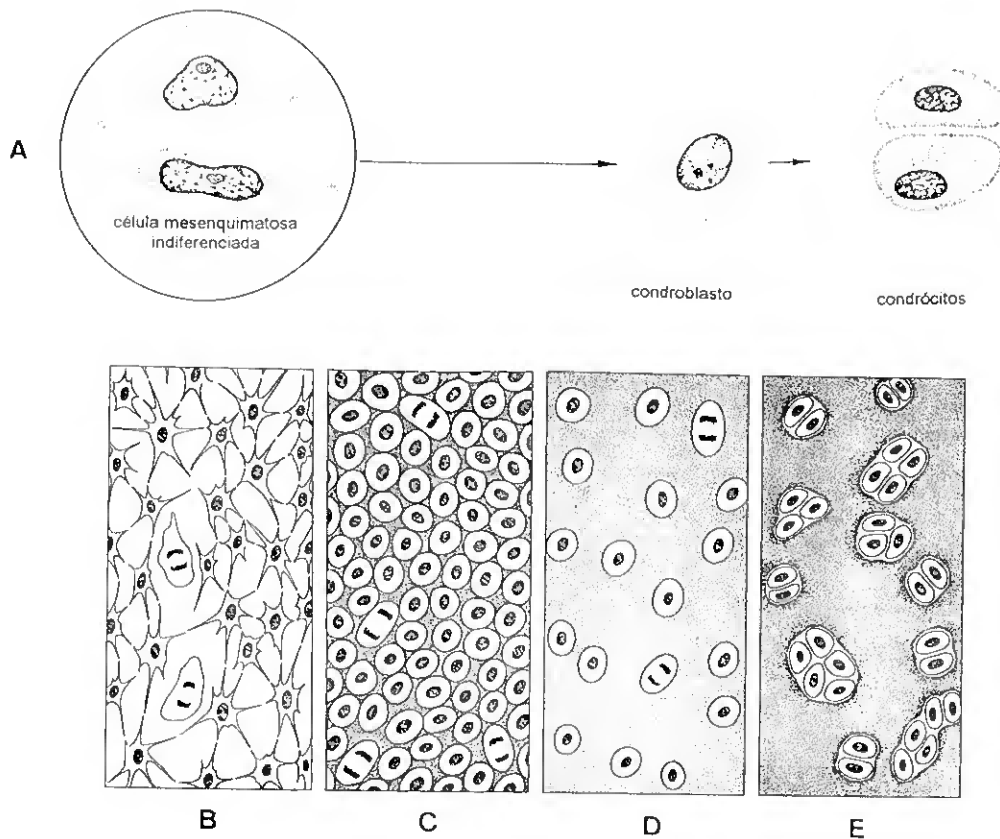


Fig. 1. Gênese da cartilagem (retirado de Junqueira *et al.*, 1995). A. esquema simplificado; B. células mesenquimatosas; C. condroblastos; D. formação da matriz e afastamento dos condroblastos; E. grupos isógenos de condrócitos.

O tecido ósseo, tal como o cartilagíneo, é também um conjuntivo especializado com origem no mesênquima (fig. 2). O osso, revestido externamente por uma membrana de natureza conjuntiva - o perióstio -, é tipicamente formado por três componentes:

- * células ósseas - **osteoblastos** (sintetizam a matriz orgânica), **osteócitos** (provável participação na deposição e reabsorção do osso) e **osteoclastos** (reabsorvem osso);
- * material orgânico extracelular ou **matriz orgânica** (rede de fibras de colagénio tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas);

* **material mineral extracelular**, essencialmente cristais de hidroxiapatite (sais de carbonato e fosfato de cálcio).

Além disso, o osso é frequentemente vascularizado e submetido a processos de reabsorção e deposição.

Nos Osteóctios, podem encontrar-se ossos com estas características. No entanto, os traços histológicos dos tecidos ósseos são passíveis de variar consoante as espécies, os ossos considerados e, às vezes, a parte específica do osso (Meunier & Huisseune, 1992).

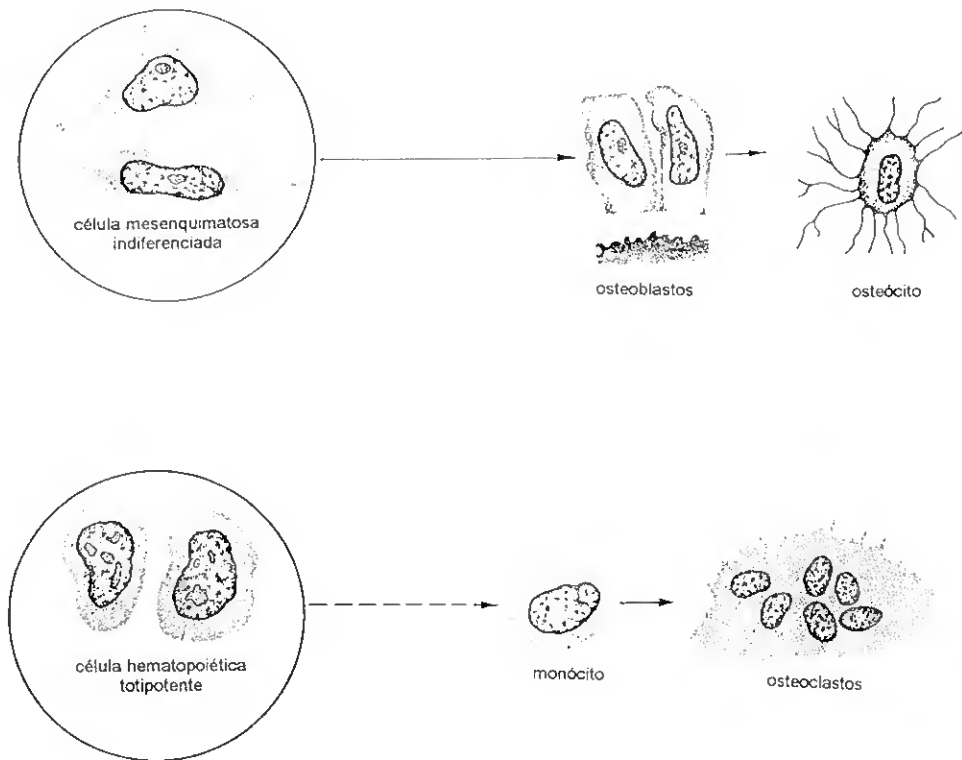


Fig. 2. Esquema simplificado da gênese das células ósseas (retirado de Junqueira *et al.*, 1995).

2.1. ESTRUTURAS DO APARELHO ESQUELÉTICO E TIPOS DE OSSIFICAÇÃO

Em *S. aurata*, além dos trabalhos referidos no capítulo I, pouca informação se tem sobre a constituição do aparelho esquelético. Albuquerque (1954-1956)

apenas refere que a coluna vertebral é composta por 24 vértebras e sugere a seguinte fórmula, para a guarnição de espinhas/raios moles nas barbatanas:

- b. peitorais** - 16, em cada;
- b. ventrais (pélvicas)** - I/5, em cada;
- b. dorsal** - XI/13;
- b. anal** - III/11-12.

No entanto, em sparídeos (p. ex. Aloncle, 1966; Houde & Potthoff, 1976; Matsuoka, 1985, 1987) e em outros teleósteos (p. ex. Gwyn, 1940; Potthoff & Kelley, 1982; Potthoff *et al.*, 1984; Balart, 1985; Potthoff *et al.*, 1986; Balart, 1990; Fujita, 1992 a; Huysseune & Sire, 1992; Vandewalle *et al.*, 1992; Fujita, 1994; Fujita & Oozeki, 1994; Balart, 1995; Ichiyangi & Fujita, 1995) vasta literatura está disponível, quer em relação a todo o esqueleto, quer em relação a parte(s) dele.

Segundo Matsuoka (1987), as estruturas que fazem parte do aparelho esquelético do sparídeo *Pagrus major*, com exceção do esqueleto cefálico, são:

Coluna vertebral (fig. 3) - constituída por 24 vértebras, cada uma delas formada por um *centrum* (corpo da vértebra). A 24^a (uróstilo) é uma vértebra modificada que, tal como a 22^a e 23^a, fazem parte do complexo caudal. Todos os *centra*, com exceção do 24^o, suportam na parte superior um arco neural que protege a espinal medula. Estes, por sua vez, apresentam dorsalmente protuberâncias, a que se dá o nome de espinhas neurais. Por baixo de cada *centra* (do 11^o ao 23^o), existe um arco que suporta as veia e artéria caudais. Cada arco é protegido por uma espinha hemal. Cada *centrum* (do 3^o ao 10^o) suporta duas costelas pleurais laterais, uma em cada lado. Os doze primeiros *centra* suportam ainda, cada um, duas costelas dorsais.

Complexo caudal (fig. 4) - composto por três epurais, cinco hipurais, um parahipural, três *centra* incluindo o uróstilo, um arco neural e espinha, dois arcos hemais e espinhas, dois pares de uroneurais, um arco neural especializado, dezassete (9+8) raios principais e oito cartilagens acessórias.

Barbatana dorsal e estruturas de suporte (fig. 5) - formado por três pré-dorsais, vinte radiais proximais, vinte radiais distais, um número variável de radiais médios (2 a 4) e, no geral, doze espinhas e dez raios moles.

Barbatana anal e estruturas de suporte (fig. 5) - é constituído por nove radiais proximais, nove radiais distais, número variável de radiais médios (1 a 4) e normalmente três espinhas e oito raios moles.

Barbatanas peitorais e cintura peitoral (escapular) (fig. 6) - cada conjunto é formado pelas seguintes peças: *cleitrum*, coracóide, escápula, quatro "actinosts", *supracleitrum*, pós-temporal, *pós-cleitrum* inferior, *pós-cleitrum* superior, *propterygium*, supratemporal inferior, supratemporal superior, treze a quinze radiais distais, número variável de raios moles (14 a 16).

Barbatanas ventrais (pélvicas) e cintura pélvica (fig. 7) - em cada conjunto, encontra-se um *basipterygium*, um *metapterygium*, uma espinha e cinco raios moles.

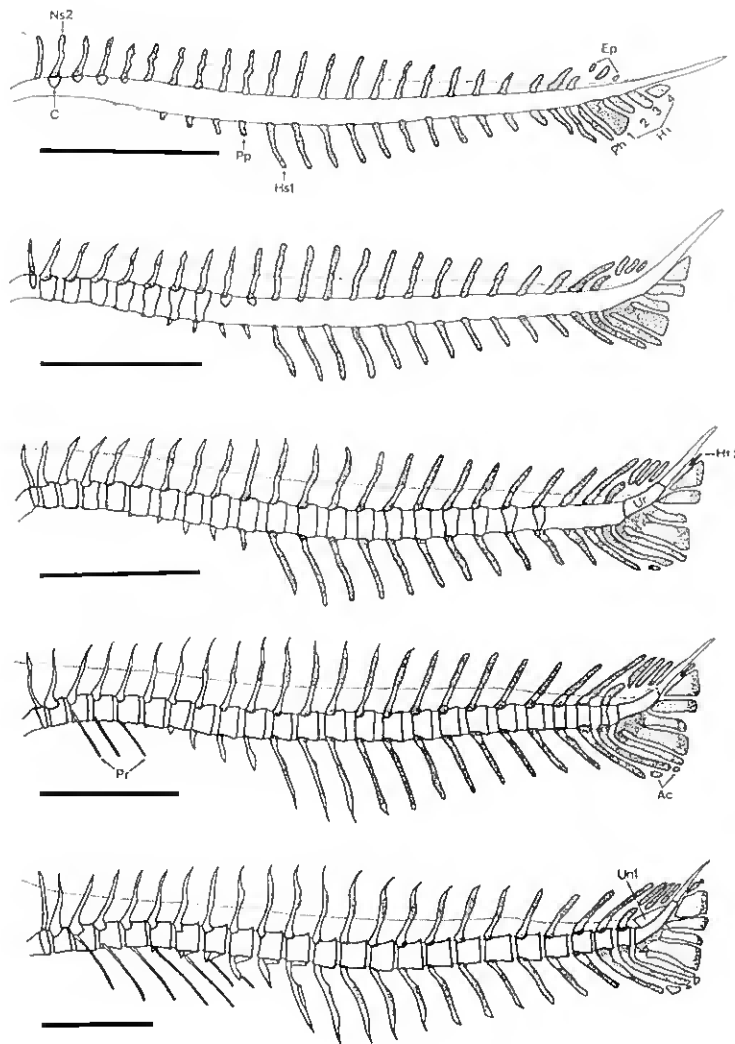


Fig. 3. Diferentes fases do desenvolvimento da coluna vertebral e complexo caudal em *P. major* (retirado de Matsuoka, 1987). Áreas ponteadas - cartilagem. Áreas levemente ponteadas - início da ossificação. Áreas brancas - tecido ósseo. Ac, Cartilagem acessória; C, *centrum*; Ep, epurais; Hi, hipural; Hs, espinha hemal; Ns, espinha neural; Ph, parahipural; Pp, parapófise; Pr, costela pleural; Un, uroneural; Ur, uróstilo. As barras representam 1 mm.

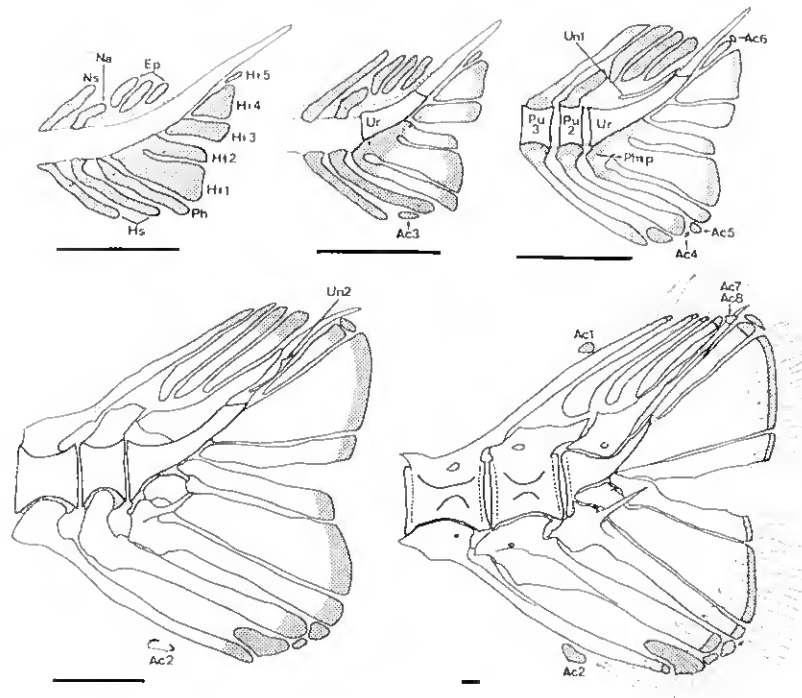


Fig. 4. Diferentes fases do desenvolvimento do complexo caudal e cartilagens acessórias em *P. major* (retirado de Matsuoka, 1987). Áreas ponteadas - cartilagem. Áreas levemente ponteadas - início da ossificação. Áreas brancas - tecido ósseo. "Na", arco neural especializado; Phip, parahipurapófise; Pu, *centrum* pré-ural. Para outras abreviaturas ver fig. 3. As barras representam 0.5 mm.

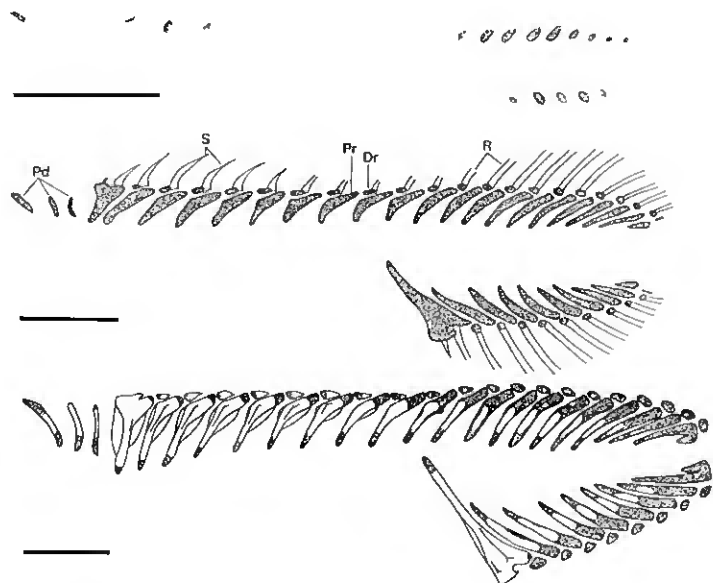


Fig. 5. Diferentes fases do desenvolvimento das barbatanas dorsal e ventral e respectivas estruturas de suporte em *P. major* (retirado de Matsuoka, 1987). Áreas ponteadas - cartilagem. Áreas brancas - tecido ósseo. Dr, radial distal; Pd, prédorsais; Pr, radial proximal; R, raio mole; S, espinha. As barras representam 0.5 mm.

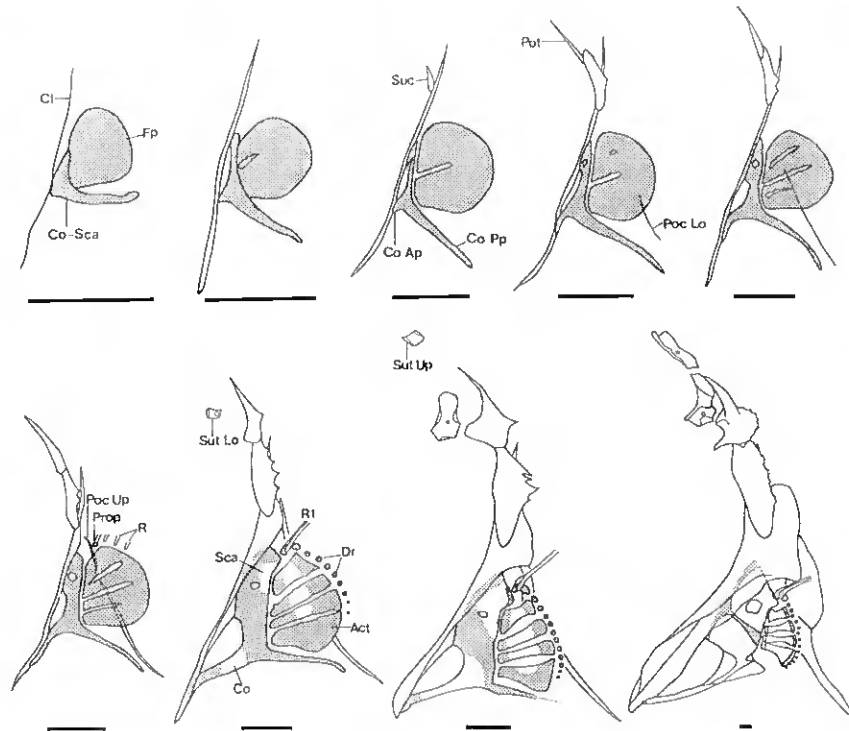


Fig. 6. Diferentes fases do desenvolvimento das barbatanas peitorais e respectiva cintura em *P. major* (retirado de Matsuoka, 1987). Áreas ponteadas - cartilagem. Áreas brancas - tecido ósseo. Act, "actinost"; Cl, *cleitrum*; Co, coracóide; Co-Sca, conjunto cartilaginosa coracóide-escápula; Dr, distais radiais; Fp, placa cartilaginosa da barbatana; Poc Lo, *pós-cleitrum* inferior; Poc Up, *pós-cleitrum* superior; Pot, pós-temporal; Prop, *propterigium*; R, raio mole; Sca, escápula; Suc, *supracleitrum*; Sut Lo, supratemporal inferior; Sut Up, supratemporal superior. As barras representam 0.3 mm.

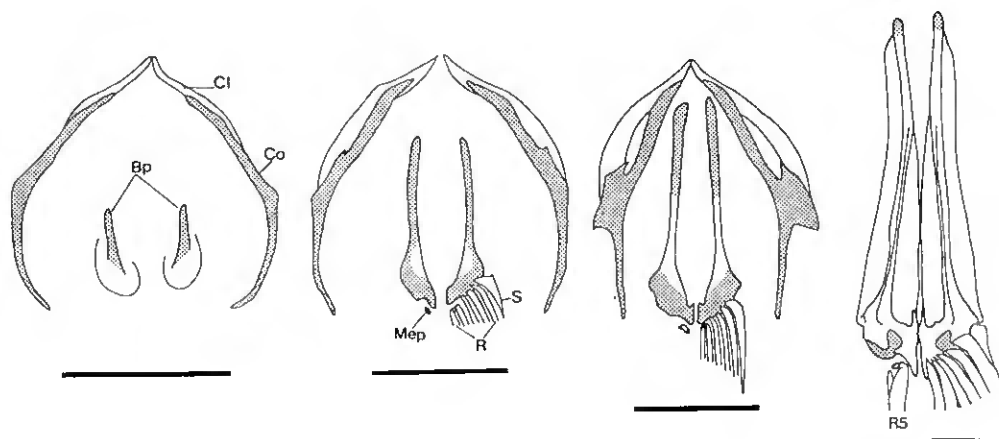


Fig. 7. Diferentes fases do desenvolvimento das barbatanas ventrais e respectiva cintura em *P. major* (retirado de Matsuoka, 1987). Áreas ponteadas - cartilagem. Áreas brancas - tecido ósseo. Bp, *basipterigium*; Mep, *metapterigium*; S, espinha. Para outras abreviaturas ver fig. 6. As barras representam 0.5 mm.

Em outro sparídeo, *Archosargus rhomboidalis*, Houde & Potthoff (1976) fazem uma descrição semelhante, com as seguintes exceções:

* *A. rhomboidalis* apresenta duas barbatanas dorsais e respectivas estruturas de suporte. Além de três pré-dorsais, a primeira é formada por onze radiais proximais e onze radiais distais, os quais suportam treze espinhas. A segunda, com dez/onze raios moles fica completa com igual número de radiais proximais e de radiais distais e dois radiais médios, situados entre os dois radiais proximais e distais posteriores.

* A estrutura de suporte da barbatana anal é constituída por onze (raramente doze) radiais proximais, igual número de radiais distais e um radial médio localizado entre o último radial proximal/radial distal. A barbatana apresenta três espinhas e dez raios moles.

* Cada cintura escapular é formada por um *cleitrum*, dois *pós-cleitrum*, uma escápula, quatro radiais e um coracóide, sendo cada barbatana guarnecida por catorze raios moles, que são suportados por igual número de radiais distais.

Uma particularidade dos tecidos esqueléticos dos peixes é o de apresentarem um crescimento quase ilimitado. A osteogénese, em particular, faz-se durante todo o ciclo de vida, com interrupção ou abrandamento durante os períodos de sub-alimentação (Bertin, 1958) de desenvolvimento das gónadas e reprodução ou de senescência (Balon, 1986; Jobling, 1995; Kamler, 1995).

Segundo Bertin (1958), a osteogénese nos peixes é um fenómeno complexo e multiforme, pelo que a distinção clássica entre osso de membrana e osso de cartilagem se torna demasiado esquemática, de forma a enquadrar toda a complexidade histológica. Bujard (1931) sugere quatro tipos diferentes de ossificação:

ossificação acondral (metaplasia conjuntivo-óssea) - dá-se na ausência total de cartilagem e, por consequência, no seio de tecido conjuntivo fibroso, como p. ex. o anel esqueletogénico (*centra* das vértebras). Consideram-se duas fases: uma em que as células do tecido conjuntivo se transformam em osteoblastos e outra em que se dá a diferenciação da substância fundamental, numa substância pré-óssea mole que se ossifica posteriormente. A ossificação acondral continua por uma ossificação perióstica e por uma modificação completa da substância óssea primitiva. Camadas novas depositam-se à periferia, enquanto que o centro é destruído pelos osteoclastos e reconstruído pelos osteoblastos, numa nova ordem. Nos teleósteos, a uma estrutura inicial trabecular, segue-se uma esponjosa definitiva.

ossificação paracondral (metaplasia conjuntivo-óssea) - o osso forma-se a partir do tecido conjuntivo, mas na vizinhança dum esboço cartilágneo. É o caso de muitos ossos do crânio que se desenvolvem ao redor das cápsulas nasais, ópticas e óticas e da mandíbula que se desenvolve em volta da cartilagem de Meckel. A primeira fase é idêntica à da ossificação acondral, até ao momento em que os tabiques ósseos entram em contacto com a cartilagem. Posteriormente, invadem-na, provocam a sua degenerescência e substituem-na por uma formação óssea endocondral.

ossificação pericondral (metaplasia conjuntivo-óssea) - começa pelo contacto directo com a cartilagem, no pericôndrio, e não pela parte exterior, como no caso precedente. Por um lado, passa-se rapidamente a uma ossificação perióstica, logo que o pericôndrio se torna perióstio e por outro, a uma ossificação endocondral, assim que os tabiques ósseos começam a penetrar no interior da cartilagem.

ossificação endocondral (neoplasia condro-óssea) - é a consequência e a continuação da ossificação pericondral. Começa por uma modificação da cartilagem, cujas células se hipertrofiam e entram em contacto umas com as outras, a que se segue uma desidratação e retracção da substância fundamental. Desta forma, a cartilagem fica cheia de cavidades irregulares (lacunas), cujos tabiques calcificados servem de suporte à ossificação, pelo que todos os espaços abandonados pela cartilagem são preenchidos por uma neoformação óssea. Condrólise e osteogénese "caminham" pois lado a lado.

Cormack (1984) e Junqueira *et al.* (1995), por sua vez, apenas consideram dois tipos de ossificação: a **ossificação intramembranosa** (fig. 8) e a **ossificação endocondral** (fig. 9) que correspondem respectivamente às ossificações acondral e endocondral referidas por Bujard (1931).

No presente estudo decidimos adoptar somente os termos de ossificação acondral e endocondral. Apesar de ser de algum modo redutor utilizar apenas estes dois padrões, consideramos ser difícil, se não mesmo impraticável, distinguir em exemplares inteiros, um tipo preciso de ossificação a partir de cartilagem pré-existente.

A calcificação é um processo que não está ainda completamente esclarecido. Sabe-se que começa pela deposição de sais de cálcio nas fibrilhas de colagénio, num mecanismo induzido pelos proteoglicanos e sobretudo pelas glicoproteínas, já que estas apresentam uma alta afinidade para o cálcio.

A deposição dos sais de cálcio é provavelmente acelerada pela capacidade dos osteoblastos em concentrá-los em vesículas intracitoplasmáticas, libertando o seu conteúdo, no meio extracelular, quando necessário (Junqueira *et al.*, 1995).

Asakura (1978, *in* Establier, 1986), Ingleton *et al.*(1983), Leach *et al.*(1995), sugerem que a calcificação é ajudada, numa via desconhecida, pela fosfatase alcalina já que esta está presente nos sítios de ossificação.

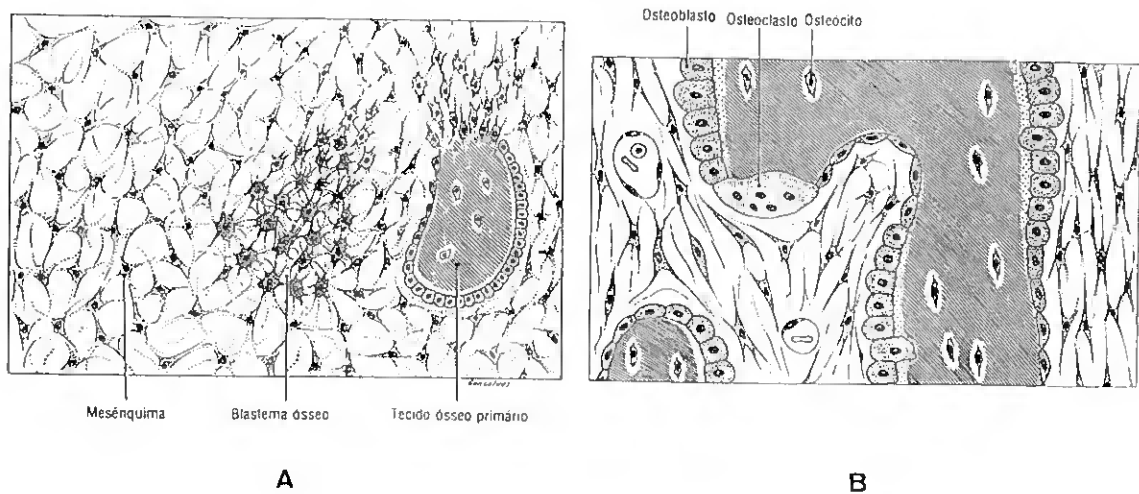


Fig. 8. Ossificação intramembranosa (retirado de Junqueira *et al.*, 1995). A - Início; B - fase adiantada.



Fig. 9. Fotomicrografia da ossificação endocondral (retirado de Junqueira *et al.*, 1995).

2.2. METABOLISMO DO CÁLCIO E GLÂNDULAS CALCÉMICAS

O íon cálcio (Ca^{2+}) é um elemento fundamental em numerosas funções fisiológicas dos vertebrados. Além da sua importância no crescimento ósseo, este catião divalente está associado a outros processos intra e extracelulares, p. ex., a manutenção do potencial de membrana das células, o mecanismo da replicação celular e como mensageiro secundário (Hadley, 1992).

O metabolismo do Ca^{2+} entre o plasma e o tecido ósseo é um processo complexo. A sua regulação está ligada à regulação do íon fosfato, uma vez que o osso tem como substâncias fundamentais o carbonato e o fosfato de cálcio. Assim, ao dar-se a decomposição do osso (osteólise), liberta-se simultaneamente o cálcio e o fósforo. Por outro lado, durante a formação do osso (osteogénese), o armazenamento do cálcio sob a forma de fosfato de cálcio, exige a presença de fósforo (Galhardo & Anaia Cristo, 1989).

A matriz óssea apresenta níveis de Ca^{2+} mais baixos do que o fluido extracelular, logo o Ca^{2+} difunde-se constantemente do exterior para a matriz óssea, através dos canais existentes entre os osteoblastos. As bombas de Ca^{2+} dos osteoblastos devolvem Ca^{2+} ao fluido extracelular. Este intercâmbio dinâmico de Ca^{2+} entre os fluídos corporais e o Ca^{2+} permutável da matriz óssea possibilita a regulação e modificação do plasma, independentemente da actividade dos osteoclastos e osteócitos (Withers, 1992).

Nos vertebrados superiores, além do osso, verifica-se ainda a actuação dos mecanismos reguladores da calcémia no lúmen intestinal, onde se efectua a absorção de cálcio para o sangue e no rim, onde se realiza a reabsorção do cálcio (Galhardo & Anaia Cristo, 1989; Withers, 1992) (fig. 10).

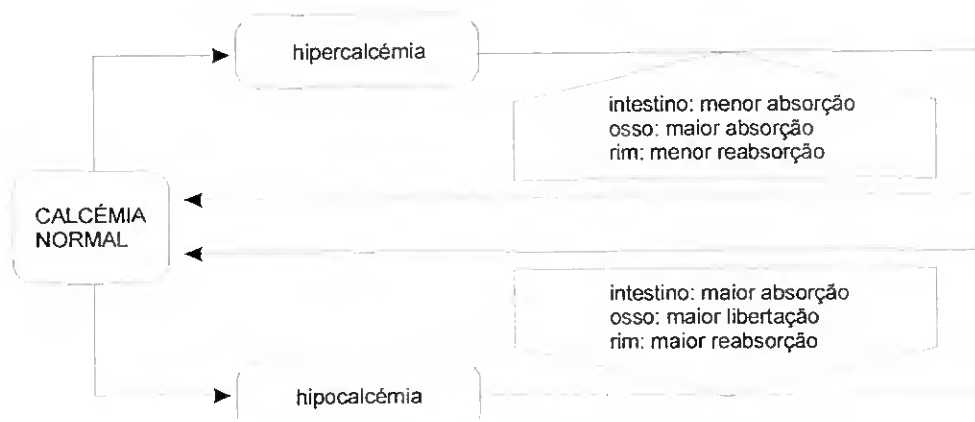


Fig. 10. Mecanismo homeostático da calcémia (retirado de Galhardo & Anaia Cristo, 1989).

A capacidade que todos os vertebrados apresentam de regular os níveis internos de cálcio, a valores diferentes do meio envolvente, é um importante factor de adaptação a condições ambientais variáveis. Mudanças nos níveis de cálcio intercelular, para além dos limites fisiológicos toleráveis, leva a distúrbios das funções neurais, musculares e cárdio-vasculares, o que pode resultar em tetania (hipocalcémia), letargia (hipercalcémia) e eventual morte (Flik *et al.*, 1995).

Nos vertebrados terrestres o cálcio é obtido através do alimento, uma fonte de cálcio falível e inconstante. Este facto e o carácter episódico da alimentação, pode ter sido a força motora para a evolução do osso como reservatório de cálcio e para o desenvolvimento de um complexo sistema de células ósseas e vasos sanguíneos, de modo a permitir a mineralização e deposição do osso. Esta função de reservatório permite aos vertebrados terrestres sobreviver a períodos de carência ou a períodos em que as necessidades em cálcio são elevadas, como p. ex., o crescimento ou a reprodução (Wendelaar Bonga & Pang, 1992).

As hormonas que controlam estes fenómenos são sobretudo a PTH, sintetizada nas glândulas paratiróides e a 1,25-dihidroxitamina D₃, as quais permitem o aumento dos níveis de cálcio na circulação e a CL, produzida nas células parafoliculares da tiróide, que está associada à diminuição dos níveis deste ião (Hadley, 1992; Wendelaar Bonga & Pang, 1992). Outras hormonas envolvidas no metabolismo do cálcio dos vertebrados terrestres, ainda que de importância secundária, são a PRL, a GH e os estrogénios (Wendelaar Bonga & Pang, 1992).

No que respeita aos peixes, a situação é completamente diferente, já que, além do alimento, têm acesso ao Ca²⁺ presente na água. Quer se trate de água salgada, em que as concentrações estão acima dos níveis dos fluídos intercelulares, quer se trate de água doce, em que as concentrações são semelhantes ou estão abaixo desses níveis internos, os peixes são capazes de utilizar o cálcio da água.

Nestes, a regulação da calcémia é um processo para o qual há algumas indicações, mas poucas certezas.

Até ao momento, em peixes, não foi referida a presença de glândulas paratiróides, no entanto D. Power (comunicação pessoal) detectou na circulação de alguns, PTH imunorreactiva.

Parsons *et al.* (1979, *in* Ingleton & Danks, 1996), a partir de estudos efectuados em bacalhau (*Gadus morhua*) e enguia (*Anguilla anguilla*), sugeriram que a pituitária dos peixes contém um factor hipercalcémico, relacionado mas, distinto da PTH. Apesar de Kaneko & Pang (1987) e Fraser *et al.* (1991, *in* Flik *et al.*,

1995) indicarem que esse factor seria a PTH-rP (*Parathyroid hormone - related protein*), um péptido descoberto em 1987 (Burtis *et al.*, 1987; Moseley *et al.*, 1987; Strewler *et al.*, 1987; Suva *et al.*, 1987) foram, no entanto, Danks *et al.* (1993) os primeiros a detectar PTH-rP nas células da *pars intermedia* e da *pars distalis* da pituitária e em meios de incubação de pituitária de *S. aurata*. Por outro lado, Ingleton *et al.* (1995) e Devlin *et al.* (1996) observaram que algumas células epiteliais do *saccus vasculosus*, órgão neuro-hemal associado com o cérebro de alguns peixes cartilagíneos e teleósteos, continham e secretavam PTH-rP.

Nos peixes ósseos, a CL (produzida na glândula ultimobranquial ¹), parece ter um papel limitado na homeostasia do cálcio, a qual é sobretudo regulada pela STC (sintetizada nos corpúsculos de Stannius ²) e pela PRL (Lafeber *et al.*, 1988; Hanssen *et al.*, 1991; Wendelaar Bonga & Pang, 1992), embora Wendelaar Bonga & Pang (1992) tenham argumentado que a função da CL é essencialmente proteger o esqueleto em períodos de grande necessidade de cálcio (p. ex. crescimento, vitelogénese e reprodução).

Por sua vez, Bjornsson *et al.* (1989) referem que a CL provavelmente tem um papel mais significativo na reprodução do que na regulação do cálcio, enquanto que Norberg *et al.* (1989), ao mesmo tempo que apoiam esta hipótese, sugerem que nos salmonídeos, esta é uma hormona relacionada com a reprodução. Da mesma forma, Fouchereau-Peron *et al.* (1990) indicam que na truta arco-íris existe uma relação íntima entre a CL e a maturação sexual, embora o mecanismo não esteja esclarecido.

Estudos mais recentes (Oughterson *et al.*, 1995) sugerem que a CL participa na homeostasia do cálcio, já que é capaz de influenciar os níveis de cálcio presentes na circulação e, ao mesmo tempo, ser influenciada pelo cálcio externo, embora não seja a única hormona envolvida neste processo.

Tanto em peixes de água doce, como em peixes marinhos, a STC é uma hormona que tem uma rápida e efectiva acção na redução do cálcio, ao nível das brânquias (Hirano, 1989, *in* Flik, 1995; Wagner & Friesen, 1989; Verbost *et al.*, 1993; Wagner *et al.*, 1996), do intestino (Sundell *et al.*, 1992 a, *in* Flik, 1995; Wagner, 1996) e provavelmente do rim (Flik *et al.*, 1996). Segundo Wendelaar Bonga & Pang (1992), nas brânquias, a STC é o factor inibitório dominante, enquanto a PRL e o cortisol "representam" papéis acessórios. No intestino, embora o papel desempenhado pela STC seja de inegável valor, a acção principal parece ser efectuada pela 1,25-diidroxivitamina D₃ (Flik *et al.*, 1982; Sundell & Bjornsson, 1990).

1. Glândula ultimobranquial - Nos peixes esta glândula é ímpar e localiza-se no tecido conjuntivo, perto do coração. Constituída por células endócrinas, que produzem a hormona calcitonina, e por células não glandulares, as quais mostram semelhança estrutural com as células radiadas da pituitária (Wendelaar Bonga, 1993).

2. Corpúsculos de Stannius - Pequenas glândulas endócrinas típicas dos holósteos e teleósteos, normalmente em nº par. Situam-se sobre ou no interior do rim (Lopez *et al.*, 1984; Flik, 1990; Wendelaar Bonga, 1993; Jobling, 1995). Produzem a staniocalcina, uma hormona hipocalcémica única para estes peixes ósseos.

III. CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE

3.1. ECOLOGIA E HABITAT

A dourada, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) é um peixe costeiro eurihalino, suportando salinidades entre os 4‰ e os 70‰ (Fisher *et al.*, 1987). No Mediterrâneo e durante a primavera, os juvenis podem ser encontrados em águas salobras de lagoas, regressando no fim do outono ao meio marinho (Quéro, 1984).

Suporta temperaturas entre os 5 e os 32° C (Cnexo, 1983). Segundo Quéro (1984), a dourada é um peixe sensível ao frio, já que um arrefecimento repentino das águas origina, normalmente, uma elevada mortalidade.

O seu habitat situa-se nas zonas litorais, podendo os juvenis atingir 30 m de profundidade e os adultos 150 (Fisher *et al.*, 1987). Sedentária, vive só ou em pequenos grupos, encontrando-se sobretudo em fundos arenosos envolvidos por rochas cobertas de algas ou em fundos de vaza (Quéro, 1984).

3.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Comum em todo o Mediterrâneo e também no Atlântico Este (desde as Ilhas Britânicas até às Canárias e Cabo Verde), a sua presença é muito rara no Mar Negro (Whitehead *et al.*, 1986; Fisher *et al.*, 1987)(fig. 11).

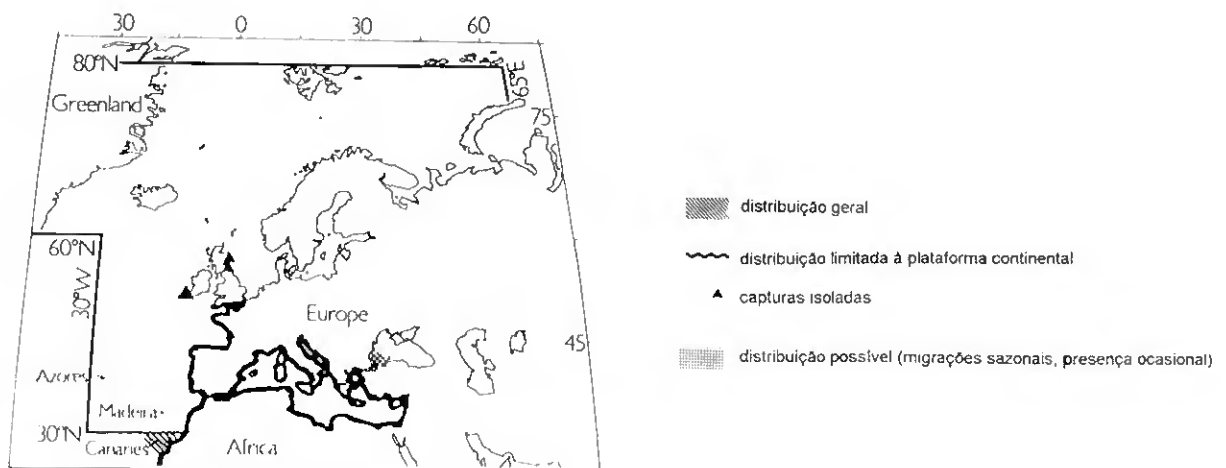


Fig. 11. Mapa com a distribuição geográfica de dourada (retirado de Fisher *et al.*, 1987).

3.3. ALIMENTAÇÃO

É uma espécie carnívora, esporadicamente herbívora (Whitehead *et al.*, 1986; Fisher *et al.*, 1987), sendo o seu regime alimentar constituído por moluscos bivalves, crustáceos, peixes e por vezes algas (Quéro, 1984). Arias (1980), em estudos levados a cabo nos esteiros de Cádiz, constatou que, para além de moluscos e crustáceos, a sua alimentação era também composta secundariamente por poliquetas, algas e ocasionalmente peixes e insectos.

3.4. MORFOLOGIA EXTERNA (fig. 12)

Com simetria bilateral e corpo oval fortemente comprimido lateralmente, a dourada possui dorsalmente cor cinzento prateado que, progressivamente, se vai esbatendo para branco prateado, ao longo de toda a região inferior do corpo.

Apresenta uma faixa dourada entre os olhos e no início da linha lateral, em ambos os lados, uma mancha preta.

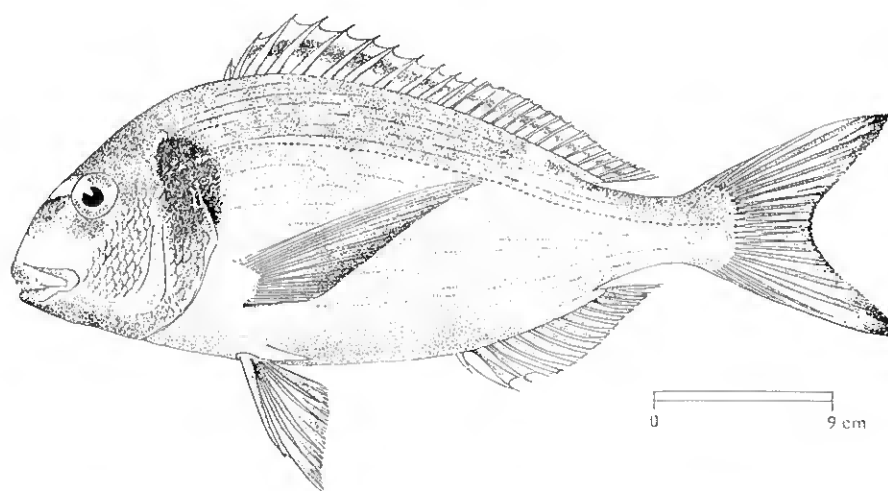


Fig. 12. Desenho científico de *S. aurata* (retirado de Fisher *et al.*, 1987).

O perfil da cabeça é regularmente convexo, com pequenos olhos, faces escamosas, pré opérculo nú, boca em posição inferior e levemente oblíqua e lábios finos. São visíveis linhas pretas longitudinais em ambos os lados do seu

corpo e a barbatana dorsal, que apresenta uma linha preta em todo o seu comprimento, possui 11 espinhos e 13-14 raios moles, ambos de natureza óssea. Ao longo da linha lateral, podem encontrar-se entre 73 a 85 escamas (Zohar *et al.*, 1995) ctenóides ósseas.

A barbatana anal caracteriza-se por ter 3 espinhos e 11-12 raios moles (Whitehead *et al.*, 1986), ambos ossificados.

A barbatana caudal, homocérquica, apresenta na zona forcal e nas pontas uma bordadura a preto (Whitehead *et al.*, 1986; Zohar *et al.*, 1995).

3.5. ORGANIZAÇÃO INTERNA

3.5.1. Tracto digestivo e estruturas anexas

Cavidade bucal

Em cada maxila, a dourada adulta apresenta entre 4 a 6 dentes caniniformes em posição anterior, a que se segue posteriormente dentes cónicos que se tornam progressivamente molariformes e estão dispostos em 2 a 4 fiadas (nas duas fiadas externas os dentes são mais fortes e desenvolvidos) (Whitehead *et al.*, 1986; Zohar *et al.*, 1995) (fig. 13).

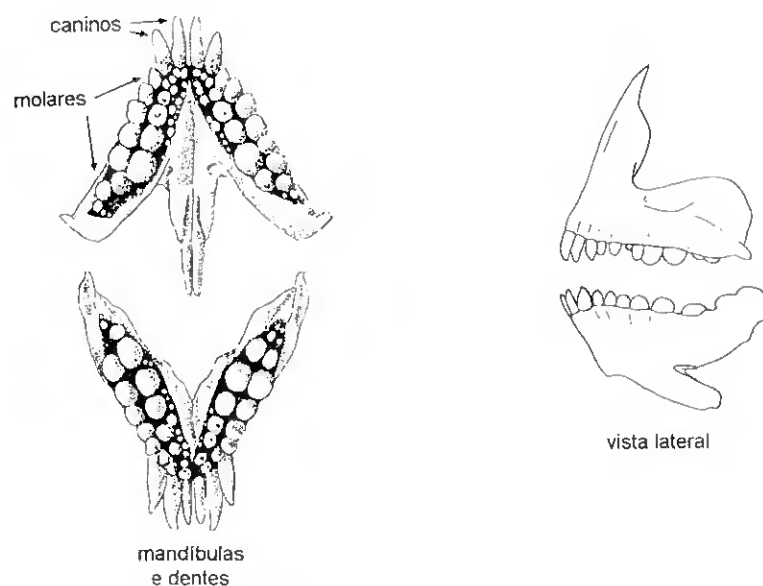


Fig. 13. Esquema dos dentes e mandíbulas de dourada (retirado de Fisher *et al.*, 1987).

Na parte posterior do palato, encontra-se um órgão faríngeo (fig. 14) formado por valvas denticuladas, as quais facilitam a ingestão dos alimentos (Cataldi *et al.*, 1987).

A mucosa da boca está coberta por epitélio escamoso estratificado, no qual se encontram células mucosas (Cataldi *et al.*, 1987).

Esófago

O esófago (fig. 14) apresenta uma mucosa bastante pregueada com especial incidência na zona adjacente ao estômago (Elbal & Agulleiro, 1986; Cataldi *et al.*, 1987).

A mucosa é constituída por um epitélio pluriestratificado (Cataldi *et al.*, 1987; Borrás & Mínguez, 1993) contendo, na primeira metade, células secretoras de muco (Cataldi *et al.*, 1987), o qual favorece o movimento dos alimentos (Borrás & Mínguez, 1993).

A túnica muscular é bastante espessa, especialmente na primeira porção do esófago e consiste em fibras musculares estriadas que formam, exteriormente, uma camada circular contínua e, interiormente, uma camada longitudinal bastante larga (Cataldi *et al.*, 1987).

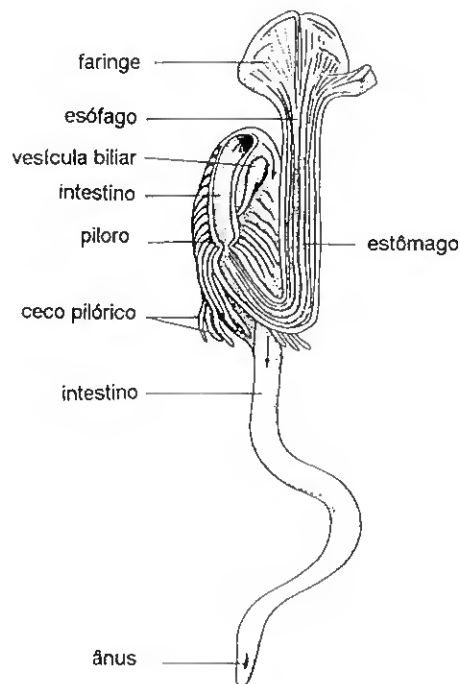


Fig. 14. Tracto digestivo de teleosteo (retirado de Walker, Jr. & Liem, 1994)

Estômago

É no estômago (fig. 14) que se inicia a digestão dos alimentos, já que a sua retenção permite o seu fraccionamento em pequenas partículas, pela acção dos sucos gástricos.

A túnica muscular do estômago é formada por fibras estriadas que, na parte inicial, mantêm a mesma disposição do verificado no esófago, mas que gradualmente vão sendo substituídas por fibras lisas. A musculatura longitudinal aparece na parede externa, persistindo ao longo do resto do tracto digestivo, sendo a musculatura circular bastante espessa na zona pilórica (Cataldi *et al.*, 1987).

Sem zona de transição, a mucosa gástrica substitui directamente a mucosa esofágica. No estômago, a mucosa forma dobras e cavidades, sendo constituída por epitélio colunar. A superfície livre das células epiteliais apresenta-se lisa, esporadicamente com pequenas vesículas cilíndricas (Cataldi *et al.*, 1987).

Glândulas gástricas tubulares simples encontram-se presentes na região cardíaca, aumentando o seu número na parte mais inferior, mas encontrando-se ausentes na região pilórica (Cataldi *et al.*, 1987).

Intestino e cecos pilóricos (fig. 14)

O intestino inicia-se por quatro pequenos cecos pilóricos, na base dos quais abrem os ductos hepático e pancreático (Cataldi *et al.*, 1987).

Os cecos pilóricos, que apresentam uma estrutura semelhante ao estômago (Elbal & Agulleiro, 1986), possuem um epitélio colunar simples com microvilosidades maiores e em maior número do que na parte final do intestino (Cataldi *et al.*, 1987). Não tendo funções secretoras, intervêm na absorção dos lípidos e servem para ampliar a superfície interna, armazenar os alimentos e aumentar o tempo do trânsito intestinal (Borrás & Mínguez, 1993).

O intestino dos teleósteos varia em comprimento conforme os hábitos alimentares e a dieta individual (Lagler *et al.*, 1977; Bond, 1979; Jobling, 1995). Pode, pelo menos, distinguir-se duas regiões: um primeiro segmento que assegura a absorção dos lípidos e um segundo que capta as macromoléculas por pinocitose (Borrás & Mínguez, 1993).

A mucosa intestinal, tipicamente pregueada, é formada por uma única camada de células colunares, cujas superfícies livres estão completamente cobertas por microvilosidades. Abundantes células secretoras de muco, que aumentam em número na parte final do intestino, estão presentes no epitélio (Cataldi *et al.*,

1987).

Fígado

O fígado é composto por dois lobos, não completamente divididos. O esquerdo, mais largo, apresenta uma protuberância posterior. A vesícula biliar localiza-se dorsalmente e estende-se ao longo de toda a cavidade abdominal (Cataldi *et al.*, 1987).

É formado por uma teia de células epiteliais através da qual corre uma rede de vasos sanguíneos. O ducto hepático abre na primeira parte do intestino, depois de correr paralelamente ao pequeno ducto pancreático (Cataldi *et al.*, 1987).

Pâncreas

É uma glândula complexa formada por porções de tecido endócrino e exócrino (Walker, Jr. & Liem, 1994), que se distribui, de modo difuso e pouco visível, ao longo do tracto intestinal (Navarro *et al.*, 1993; Walker, Jr. & Liem, 1994) e que no adulto, também se infiltra no fígado (Cataldi *et al.*, 1987).

A porção endócrina, formada por um agregado de células (ilhas de Langerhans), encontra-se distribuído pelo parênquima exócrino (Cataldi *et al.*, 1987; Navarro *et al.*, 1993).



Bexiga gasosa

A bexiga gasosa dos teleósteos (fig. 15), que tem origem num divertículo dorsal do tubo digestivo, varia na sua estrutura e tem outras funções que não apenas a da flutuação, como p. ex. órgão sensorial, respiratório ou produtor de sons (Bond, 1979; Chatain, 1986). Situa-se na parte superior da cavidade abdominal, imediatamente abaixo do rim e no seu interior pode encontrar-se sobretudo oxigénio, embora outros gases, como o azoto e o dióxido de carbono, estejam presentes em proporções muito menores (Bond, 1979).

Em muitos peixes adultos (salmonídeos e enguias, p. ex.), a ligação com o intestino faz-se através do ducto pneumático - espécies fisóstomas. A dourada, tal como muitos teleósteos, perde este canal de ligação precocemente e no adulto a bexiga gasosa está completamente fechada (fig. 15), dizendo-se que é uma espécie fisoclista (Jobling, 1995).

Morfologicamente, este órgão é composto por duas regiões: uma anterior e ventral, secretora, constituída pela glândula do gás a que está associada uma

delicada rede de capilares sanguíneos, a *rete mirabili*, e outra posterior e dorsal, reabsorvente, a oval (Bertin, 1958).

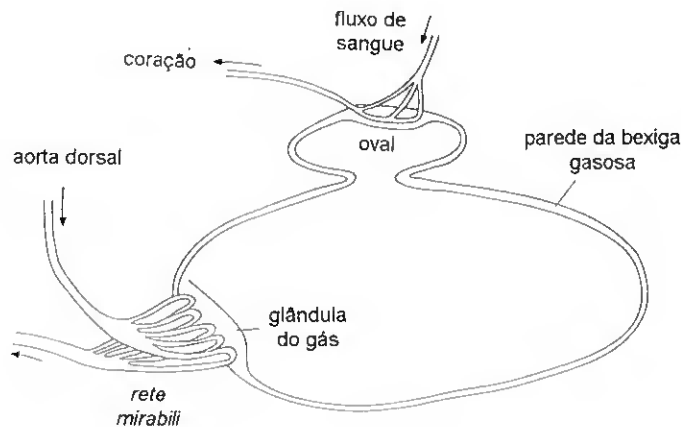


Fig. 15. Bexiga gasosa de teleosteo fisoclisto (retirado de Jobling, 1995).

A parede da bexiga gasosa é composta, internamente, por uma túnica mucosa e, externamente, por uma túnica fibrosa que reveste em parte o folheto visceral do peritoneu. O epitélio interno pode ser pavimentoso ou cilíndrico, forrado por um coríon fibroso bastante delgado, a que se segue uma camada de tecido conjuntivo laxo e vascularizado, onde se inserem, quando existentes, fibras musculares lisas (Bertin, 1958).

A glândula do gás pode apresentar um epitélio ligeiramente distinto do resto da parede da bexiga gasosa. Em alguns casos, pode consistir num epitélio enrugado ou ser um órgão maciço, cujo epitélio estratificado atinge uma espessura variável (Bertin, 1958; Lagler, 1977).

Na dourada, a bexiga gasosa primordial observa-se, por transparência, a partir do 3º dia após a eclosão (Chatain, 1986). Ela apresenta-se sob a forma de uma vesícula de pequeno tamanho, pouco translúcida, situada entre a notocorda e o tracto digestivo e frequentemente mascarada por cromatóforos. O desenvolvimento normal, a partir deste estado inicial, efectua-se em duas fases. A primeira, corresponde à insuflação primária, com o aparecimento de uma bolha de gás e é concomitante à reabsorção das reservas vitelinas e da gota lipídica. A segunda, corresponde à expansão, com a formação de outra bolha de gás mais pequena que a primeira e situada atrás desta. As duas bolhas de gás fundem-se rapidamente e a bexiga gasosa, alongando-se no sentido antero-posterior, apresenta uma forma elipsoidal (Chatain, 1986; Soares *et al.*, 1994).

3.6. CICLO DE VIDA

A dourada é uma espécie hermafrodita protândrica, já que a primeira maturação sexual é masculina, verificando-se uma inversão sexual em determinado período do seu desenvolvimento (Quéro, 1984; Fisher, 1987).

Em cativeiro e durante o primeiro ano de vida, todos os peixes são machos, o mesmo acontecendo no segundo ano, mediante determinadas condições ambientais. A partir do primeiro ou segundo ano, uma certa percentagem de machos apresenta inversão sexual (Zohar *et al.*, 1978, 1984). Segundo Fisher *et al.* (1987) e Castelló Orvay (1993), a dourada apresenta inversão sexual entre o segundo e o terceiro ano de vida, enquanto que Arias (1980) aponta para o período entre o terceiro e quarto anos.

Estudos efectuados por Happe & Zohar (1988) mostram que a proporção de machos que mudam de sexo é controlada socialmente. No entanto, é somente durante os meses de Maio a Setembro que a inversão sexual pode ser influenciada por factores sociais e hormonais, considerando-se este o período susceptível para a determinação do sexo. A presença ou aumento de peixes jovens, durante este período, faz com que aumente o número de peixes mais velhos que apresentam inversão sexual. Por outro lado, a presença ou aumento de fêmeas mais velhas pode inibir a inversão sexual nos peixes jovens.

O ciclo de vida dos peixes, desde a fecundação do ovo até à morte, pode dividir-se em cinco estados (Balon, 1986):

Estado embrionário - começa com a fecundação do ovo e caracteriza-se por nutrição endógena;

Estado larvar - inicia-se com a transição para a alimentação exógena;

Estado juvenil - tem início assim que as barbatanas estejam completamente diferenciadas e os órgãos larvares tenham regredido ou se tenham reajustado. Este período caracteriza-se por um rápido crescimento;

Estado adulto - começa com o início da maturação sexual a qual culmina com a produção dos primeiros gâmetas. Nesta altura, os recursos disponíveis estão direccionados, sobretudo para o desenvolvimento das gónadas e reprodução. Assim, a taxa de crescimento somático é, no geral, substancialmente mais baixa do que durante o período juvenil;

Estado de senescência - considera-se que, neste período, o crescimento do peixe adulto é consideravelmente reduzido ou praticamente inexistente. A produção dos gâmetas é também marcadamente reduzido.

Cada estado inicial, por sua vez, pode subdividir-se em fases, de forma a facilitar a identificação de diferentes níveis de desenvolvimento morfológico e fisiológico (Kendall *et al.*, 1984, *in* Blaxter, 1988) (anexo 1). No início do ciclo de vida, os acontecimentos do desenvolvimento reflectem uma rápida mudança quer morfológica quer fisiológica, mas nos estados seguintes a taxa de desenvolvimento vai decrescendo até à senescência e morte (Jobling, 1995; Kamler, 1995).

A teoria da ontogenia saltatória (Balon, 1986) assume que o desenvolvimento inicial é constituído por uma série de passos consecutivos estáveis, durante os quais se diferenciam e crescem várias estruturas, sendo a transição de um passo para o seguinte feita de uma forma muito rápida.

3.6.1. Maturação e postura

O desenvolvimento ovocitário é assíncrono (Carrilo & Zanuy, 1993). O crescimento faz-se a partir de pequenos conjuntos de ovócitos, mas de forma assíncrona. Durante o período de recrudescência das gónadas, estão presentes todos os estados de desenvolvimento dos ovócitos, daí que a época de postura seja prolongada e com múltiplas posturas (Carrilo & Zanuy, 1993).

Durante a postura, as fêmeas mantêm-se imóveis, enquanto que os machos nadam no meio dos ovos, fecundando-os (Zohar *et al.*, 1984). Os ovos viáveis (fecundados) são esféricos, transparentes e incolores, apresentando uma gota lipídica no centro, a qual assegura a flutuação (Lumare & Villani, 1971; Zaki, 1984; Zohar *et al.*, 1995). Estes, tal como as larvas, são pelágicos.

A desova é bentónica (entre os 5 e os 35 m). Nas águas do Mediterrâneo, a época de actividade sexual vai desde finais de Novembro até finais de Janeiro, o que equivale a dizer que a maturação sexual se inicia a partir dos 19° C e a postura se realiza, em meio natural, a temperaturas entre os 14 e os 16° C (Castelló Orvay, 1993). Em Cádiz, a reprodução faz-se de Outubro a Janeiro (Arias, 1980), no Golfo da Gasconha, de Abril a Maio (Quéro, 1984) e nas costas egípcias, de Dezembro a Fevereiro (Zaki, 1984). Segundo Zohar *et al.* (1995), em Eilat - Israel, a postura tem lugar de 15 de Janeiro a 15 de Maio.

3.6.2. Desenvolvimento embrionário e larvar

Como referido anteriormente, o estado de desenvolvimento embrionário decorre

desde o momento da fecundação até à primeira alimentação exógena. Embora seja um processo contínuo, em que os fenómenos vão ocorrendo sucessivamente (fig. 16), é costume considerar as seguintes fases na sequência embrionária:

Segmentação - o ovo fecundado sofre uma série de divisões mitóticas, dando origem a um agregado de células (**blastómeros**) que apresentam um aspecto de **mórula** e se dispõem em disco junto ao pólo animal. Como não se verifica um aumento significativo do volume do ovo segmentado, o tamanho de cada blastómero vai sendo menor à medida que se sucedem as divisões. No final da segmentação, o embrião (**blástula**) é constituído por uma única camada de células não claramente distinguíveis (**blastoderme**), apresentando uma cavidade (**blastocélio**);

Gastrulação - as células da blástula vão sofrer intensos movimentos morfogénéticos. Ao migrar para o pólo vegetal, estas envolvem o vitelo, formando-se camadas distintas de células (**gástrula**). A gastrulação termina quando os vários esboços se encontram estabilizados do ponto de vista topográfico;

Diferenciação - é a fase em que, ocorrendo sucessivas transformações de forma e de estrutura, se formam grupos celulares especializados (tecidos), o que conduz à organogénese. Com a formação do tubo neural, que é a fase mais precoce da diferenciação, o embrião entra na fase de **nêurula**;

A morfogénese progride no sentido ântero-posterior, com o aparecimento dos sómitos, dos olhos primordiais, do cérebro e das vesículas auditivas (Camus & Koutsikopoulos, 1984; Zaki, 1984);

Pré-eclosão - o embrião, no qual se observam rápidos movimentos, ocupa toda a circunferência do ovo. Aparecem os otólitos e visualiza-se nitidamente os batimentos cardíacos e a pigmentação (Camus & Koutsikopoulos, 1984; Zaki, 1984).

A postura e a duração do desenvolvimento embrionário são grandemente afectadas por factores externos, como p. ex. a salinidade (Zohar *et al.*, 1984), o fotoperíodo (Chatain & Ounais-Guschemann, 1991) e a temperatura da água. A 12° C e 17° C, a eclosão observa-se passadas, respectivamente, 72 h e 48-50 h, (Villani, 1976); a 16° C, ocorre entre as 65 e as 70 h (Zaki, 1984), enquanto que a 28° C são necessárias somente 24 h (Polo *et al.*, 1991).

Ao eclodir e medindo cerca de 2 mm, a larva da dourada é bastante transparente. Observa-se a presença da barbatana primordial (Kiriakos *et al.*, 1994), da notocorda, dos miómeros e de reduzido número de pigmentos na gota lipídica, na junção do saco vitelino com a zona posterior do corpo e nas regiões dorsal e ventral. O saco vitelino, que se situa na região antero-ventral do corpo, ocupa quase metade do comprimento total e é a fonte alimentar durante os primeiros 3-4 dias de vida após a eclosão (Lumare & Villani, 1970, 1971; Villani, 1976; Zaki, 1984). Durante este espaço de tempo, começam a desenvolver-se as barbatanas peitorais (Zaki, 1984; Kiriakos *et al.*, 1994), os olhos tornam-se

funcionais e aumenta o número de pigmentos (Zaki, 1984). Internamente, o cérebro está completamente diferenciado, o intestino apresenta-se como um longo e estreito tubo onde aparecem as primeiras pregas, desenvolvem-se os arcos branquiais e a protuberância do rim primordial é visível. Nestes primeiros dias de vida, manifestam-se actividades motoras estereotipadas, não orientadas, dependendo o ritmo endógeno das características do meio (Barnabé, 1989).

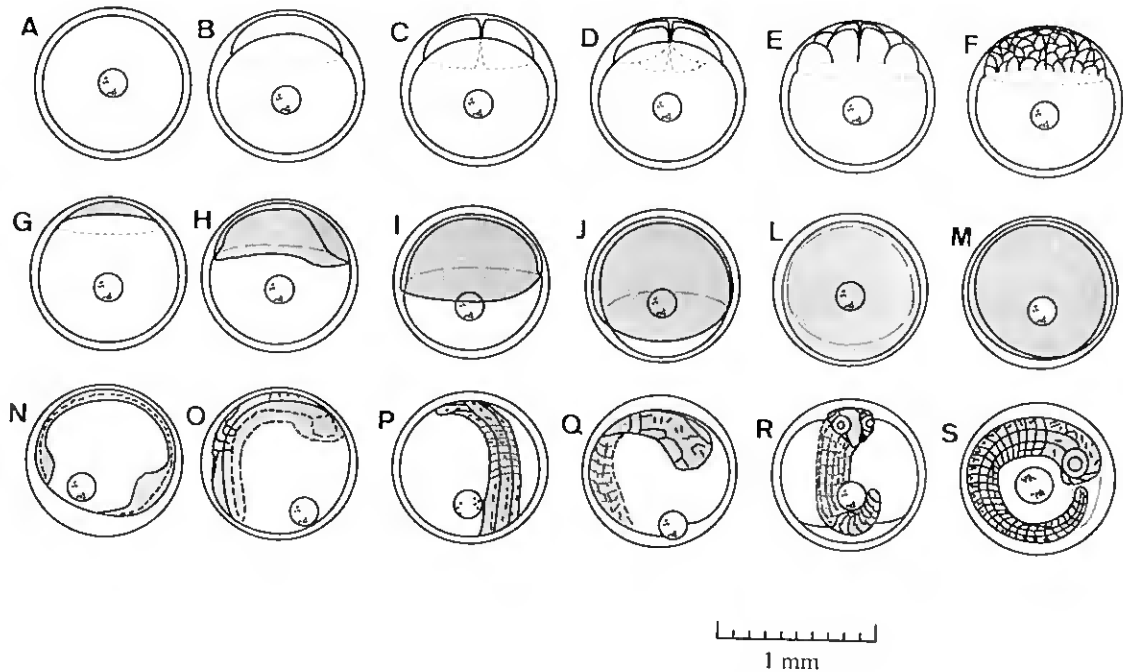


Fig. 16. Desenvolvimento embrionário de dourada, a 16 °C (retirado de Zaki, 1984, *in* Guerreiro, 1996). A - 26 min., início da expansão; B - 40 min., formação do blastodisco; C - 1 h, dois blastómeros; D - 1 h 25 min., quatro blastómeros; E - 1h 50 min., oito blastómeros; F - 3h 10 min., mórula; G - 6 h, blástula; H - 10 h, início da gastrulação; I - 13 h, gastrulação; J - 18 h, fim da gastrulação; L - idêntico ao anterior, vista dorsal; M - 20 h, gastrulação completa; N - 1 dia, início da neurulação (corpo do embrião); O - 1 dia 3h, início da segmentação da mesoderme do tronco (sómitos) e aparecimento dos primórdios do olho; P - 1 dia 3h 30 min., formação de sete sómitos; Q - 1.5 dias, diferenciação do cérebro; R - 2 dias 1h, aparecimento de cromatóforos amarelos na cabeça; S - 2 dias 15 h, embrião com vinte e oito segmentos, otólitos visíveis na vesícula auditiva, surgimento de melanócitos na cabeça e corpo.

Após a reabsorção do saco vitelino, que fica reduzido à gota lipídica, a boca e as restantes partes do tracto digestivo tornam-se funcionais e as barbatanas peitorais primordiais estão completamente formadas (Villani, 1976). Surgem as primeiras actividades orientadas em busca do alimento e uma fototaxia positiva assegura a manutenção diurna da larva numa zona superficial (Barnabé, 1989).

A fase de adaptação à alimentação exógena é considerada um período crítico, gerador de elevadas mortalidades (Lumare & Villani, 1970; Person-Le Ruyet & Verillaud, 1980; Mazzola, 1985; Barnabé, 1989; Zohar *et al.*, 1995).

IV. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, utilizaram-se exemplares de *Sparus aurata* obtidos a partir de ovos cuja postura e cultivo se efectuaram nas instalações do IPIMAR (Olhão).

Desde a eclosão até ao 50º dia, as larvas foram cultivadas em tanques de fibra de vidro cilíndrico-cónicos, com 200 l de capacidade. A partir do 50º dia após a eclosão (DPH), todos os exemplares foram transferidos para uma tanque de 1000 l. Em ambos os casos, os tanques estiveram ligados a um sistema de recirculação de água do mar e de oxigénio.

O regime alimentar foi composto por *Brachionus plicatilis*, desde que as larvas tiveram a capacidade de se alimentar de forma autónoma (3-4 dias), até ao 20º DPH; com *Artemia salina* nauplii, entre o 21º e o 50º DPH e com alimento comercial (Nippay 500/700 m), após o 51º DPH.

Os valores de temperatura e salinidade, controlados durante toda a experiência, foram respectivamente de 18 ± 1 °C e 36 ± 1 ‰.

Diariamente e entre o 1º e o 70º DPH, foram colhidos e fixados numa solução de paraformaldeído (PFA) a 1% (anexo 2), durante 24 h, 10-15 exemplares. Posteriormente, foram lavados duas vezes em TBST (anexo 2) durante 15 min. cada vez e conservados em álcool a 70%.

Um total de 142 exemplares de *Sparus aurata*, entre os 10 DPH (3.1 mm NL) e os 70 DPH (16.0 mm SL) foram utilizados neste estudo. Como NL, considera-se o comprimento entre a parte mais anterior do(s) exemplar(es) e a extremidade posterior da notocorda, antes da flexão e como SL, o comprimento entre a parte mais anterior do(s) exemplar(es) e a base posterior dos hipurais, depois do início da flexão.

Depois de terem sido processados com as técnicas de dupla coloração *whole-mount* (cartilagem/osso) e fosfatase alcalina, todos foram medidos com uma lupa Wild M3B de ocular micrométrica.

Todas as observações e fotografias foram efectuadas com um microscópio estereoscópico Wild M8, ao qual estava acoplada uma microcâmara Wild MPS 12, utilizando-se filmes Kodak Ektachrome Elite 100 em todos os registos fotográficos e tendo sido a revelação realizada num laboratório comercial.

4.1. DUPLA COLORAÇÃO *WHOLE-MOUNT* (cartilagem/osso)

a. Generalidades

A técnica de coloração *whole-mount* da cartilagem/osso é um meio indispensável para estudar o desenvolvimento do esqueleto dos peixes ósseos. Esta é uma técnica que apresenta algumas vantagens relativamente aos cortes histológicos, já que não há a possibilidade de aparecimento de artefactos que possam distorcer a morfologia dos tecidos em estudo e, além disso, fornece-nos uma visão tridimensional instantânea das estruturas coradas.

A escolha de um fixador deve ter em atenção a estabilidade e preservação dos tecidos. Para o *whole-mount*, a fixação dos exemplares numa solução de PFA, no mínimo durante 24 h, tem dado excelentes resultados (Dingerkus & Uhler, 1977; Potthoff, 1983; Klymkowsky & Hanken, 1991).

Variados corantes têm sido utilizados ao longo das últimas décadas, para a coloração da cartilagem, como p. ex. Alcian blue, Alcian green ou Toluidina blue. Todos apresentam uma elevada afinidade para os mucopolissacáridos ácidos, um dos principais componentes da matriz extracelular cartilaginosa, no entanto o mais seguro e efectivo destes corantes, para a técnica de dupla coloração cartilagem/osso, parece ser o Alcian blue 8GX (Klymkowsky & Hanken, 1991).

Para a coloração do osso, o Alizarin red S (alizarin de sódio sulfonado) tem sido amplamente utilizado (Dingerkus & Uhler, 1977; Potthoff, 1983; Klymkowsky & Hanken, 1991).

A coloração diferencial da cartilagem e do osso, em exemplares inteiros, fornece-nos importante informação que pode ser utilizada em várias áreas, relacionadas com o desenvolvimento do esqueleto, como p. ex., Anatomia Comparada, Osteologia, Teratologia, Embriologia Experimental, Biologia Evolutiva ou Taxonomia.

b. Procedimento

Para a dupla coloração com Alcian blue 8GX/Alizarin red S, utilizou-se um procedimento baseado nos trabalhos de Dingerkus & Uhler (1977), Hanken & Wassersug (1981) e Klymkowsky & Hanken (1991), com algumas alterações (tabela 1).

Durante o processamento dever-se-á ter muito cuidado com o manuseamento dos exemplares, sobretudo os mais jovens, de modo a não provocar qualquer deterioração nas suas estruturas.

Tabela 1. Dupla coloração *whole-mount* em cartilagem/osso com utilização de Alcian blue 8GX/Alizarin red S.

1. Lavar os exemplares em álcool a 50% e 25%, 30 min. cada.
2. Lavar duas vezes em água destilada, 15 min. cada vez. Limpar os exemplares em papel.
3. Imergir os exemplares em Alcian blue 8GX (anexo 2), durante 2-3 h. Limpar em papel.
4. Lavar numa série de concentrações decrescentes de álcool (100%, 100%, 95%, 70%, 40% e 15%) e em água destilada, 30 min. cada vez. Limpar em papel.
5. Para macerar, lavar numa solução de hidróxido de potássio a 1%, até que os exemplares fiquem moles e transparentes.
6. Imergir numa solução de trabalho de Alizarin red S, 20-30 µl de Alizarin red S da solução stock (anexo 2) em 10 ml de hidróxido de potássio a 1%. Verificar a coloração ao longo do dia, podendo os exemplares ficar a corar durante a noite.
7. Lavar numa série de hidróxido de potássio a 0.5%/glicerol (3:1, 1:1, 1:3) e glicerol. Deixar em cada passo, até que os exemplares caiam no fundo do recipiente. Para despigmentar, adicionar 20-30 µl de peróxido de hidrogénio a 3%, por cada 100 ml da solução do primeiro passo (3:1). A despigmentação pode levar vários dias.
8. Observar, medir e fotografar.
9. Guardar em glicerol puro. Adicionar timol ou fenol, de forma a retardar o aparecimento de bactérias.

OBS:

* Coloração (cartilagem - azul intenso; osso - vermelho)

* A coloração do tecido cartilágneo é bastante estável. Tecido ósseo fino ou de exemplares pequenos podem perder a cor vermelha, passados poucos dias, sendo, no entanto, sempre possível proceder à recoloração. Os exemplares conservados em glicerol podem voltar ao Alizarin red S, para uma mais intensa coloração do tecido ósseo e, depois, regressar ao glicerol.

4.2. FOSFATASE ALCALINA

a. Generalidades

A fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1) está amplamente distribuída nos órgãos e tecidos dos peixes. McComb *et al.* (1979, *in* Establier *et al.*, 1986) referem que esta enzima intervém em numerosas funções fisiológicas, pelo que a sua localização nos túbulos renais, nas microvilosidades intestinais, no epitélio folicular do ovário, etc., sugere a participação no transporte activo através das membranas. Noda & Tachino (1965 a, b) indicam que a fosfatase alcalina se pode encontrar no rim, no intestino, no ceco pilórico, no estômago, no baço, no fígado, nos ossos, na pele e nos músculos. Opinião semelhante é corroborada por Asakura (1978, *in* Establier *et al.*, 1986) ao argumentar que a fosfatase alcalina toma parte no processo de absorção digestiva e ossificação. Ingleton *et al.* (1983) e Leach *et al.* (1995) referem a presença de fosfatase alcalina, em níveis elevados, nas vesículas da matriz, organelos extracelulares produzidos por células como os condrócitos e os osteoblastos. Consequentemente, tem sido implicada no processo de calcificação, sugerindo que a sua presença nas membranas celulares está relacionada com a deposição de cálcio.

Na truta arco íris, a actividade da fosfatase alcalina nos ossos vertebrais é muito maior nos períodos iniciais, reduzindo-se grandemente com o crescimento, o que se verifica também em outros órgãos (Noda, 1967 a, b).

A demonstração da presença da fosfatase alcalina nos tecidos tem sido feita por uma série de técnicas, incluindo a "captura" do fosfato pelo estrôncio (Vengesa & Hopfer, 1979), a imunocitoquímica (Vaananen, 1980) e a técnica de Gomori modificada (Matsuzawa & Anderson, 1971; Salomon, 1974).

A solução de incubação deverá incluir o β -glicerofosfato, já que a sua ausência, impede a precipitação do fosfato de cálcio (Ingleton *et al.*, 1983).

Da mesma forma, é também necessário a presença de iões de magnésio, fornecidos sob a forma de cloreto ou sulfato de magnésio, já que funcionam como activadores (Noda & Tachino, 1965 b; Ingleton *et al.*, 1983), não sendo no entanto conhecido o mecanismo de activação (Matsuzawa & Anderson, 1971; Salomon, 1974).

A visualização do fosfato insolúvel pode ser feita através do nitrato de prata ou do nitrato de cobalto (Matsuzawa & Anderson, 1971; Salomon, 1974).

b. Procedimento

De forma a assegurar as melhores condições de incubação, para uma elevada actividade da fosfatase alcalina no tecido ósseo, utilizaram-se valores de pH e temperatura óptimos, respectivamente 9.4 e 37 °C (Noda & Tachino, 1965 a, b; Abe & Gotoh, 1981).

Tal como referido em 4.1.b., também nesta técnica se deve usar de toda a precaução, de modo a não danificar os exemplares, sobretudo os mais jovens.

Tabela 2. Procedimento utilizado na técnica da fosfatase alcalina (Matsuzawa & Anderson, 1971; Salomon, 1974).

1. Hidratar os exemplares, lavando-os em álcool a 50% e 25% e duas vezes em água destilada, 10 min. em cada passo.
2. Transferir os exemplares para a solução de incubação (anexo 2), durante 1/2 a 3 h a 37° C (aquecer a solução a 39° C antes de começar a incubação).
3. Lavar em água destilada, durante 10 min.
4. Imergir numa solução de nitrato de prata a 5%, durante 30 min, utilizando uma lâmpada de UV. Em alternativa, usar uma solução de nitrato de prata a 0.5% sob a acção da luz solar, dependendo o tempo de exposição da intensidade da luz.
5. Lavar os exemplares duas vezes em água destilada, 5 min em cada vez.
6. Macerar numa solução de hidróxido de potássio a 1%, até que o tecido muscular fique transparente.
7. Fixar em tiosulfato de sódio a 1-2%, durante 15 min.
8. Observar, medir e fotografar.
9. Lavar duas vezes em água destilada, 2-3 min em cada vez.
10. Desidratar, passando por uma série de concentrações crescentes de álcool (25%, 50% e 75%).
11. Guardar, a -20° C, em álcool a 100%.

OBS:

Os lugares de actividade enzimática aparecem corados de castanho escuro.

V. RESULTADOS

Na descrição dos resultados osteológicos, segue-se a terminologia de Matsuoka (1985, 1987), com excepção das estruturas de suporte das barbatanas dorsal e ventral. Assim, no lugar de radial proximal, radial distal e radial médio, utilizaram-se, respectivamente, os termos pterigióforo proximal, pterigióforo distal e pterigióforo médio.

As larvas recém eclodidas apresentam uma notocorda direita e uma ampla prega membranosa (barbatana primordial) que, à excepção da cabeça, rodeia todo o corpo e que persiste até ao desenvolvimento das barbatanas definitivas.

Desde o início da alimentação exógena, a capacidade de movimentação torna-se fundamental para a procura e captura das presas. Após a eclosão, às larvas falta-lhes uma estrutura rígida de suporte que lhes permita efectuar uma mais completa exploração do meio e minimize possíveis deformações. Se a notocorda oferece limitações neste aspecto, a sua flexibilidade, por outro lado, apresenta-se vantajosa.

Posteriormente, estas limitações são parcialmente ultrapassadas pelo aparecimento e desenvolvimento de estruturas cartilagueas, como os hipurais, arcos neurais e hemais, pterigióforos, etc.

O suporte esquelético dos raios das barbatanas inicia o seu desenvolvimento pela seguinte ordem: peitorais, caudal, dorsal e anal, pélvicas.

A descrição dos resultado é feita com base na observação de exemplares processados com as duas técnicas utilizadas.

As fotografias das figuras, sempre que não se faça referência, pertencem a exemplares processados com a dupla coloração.

As ampliações das fotografias dizem respeito ao observado directamente no microscópio.

5.1. COLUNA VERTEBRAL

Em exemplares com 4.1 mm NL, não se observaram arcos neurais ou hemais, verificando-se o começo do desenvolvimento do hipural 1 (fig. 17).

Com 4.4 mm NL, é possível observar o início da formação dos segundo e terceiro arcos neurais cartilagineos e oito arcos hemais. Cada arco neural consiste em duas hastes cartilagineas que se formam latero-dorsalmente em relação à notocorda, unindo-se posteriormente (fig. 18).

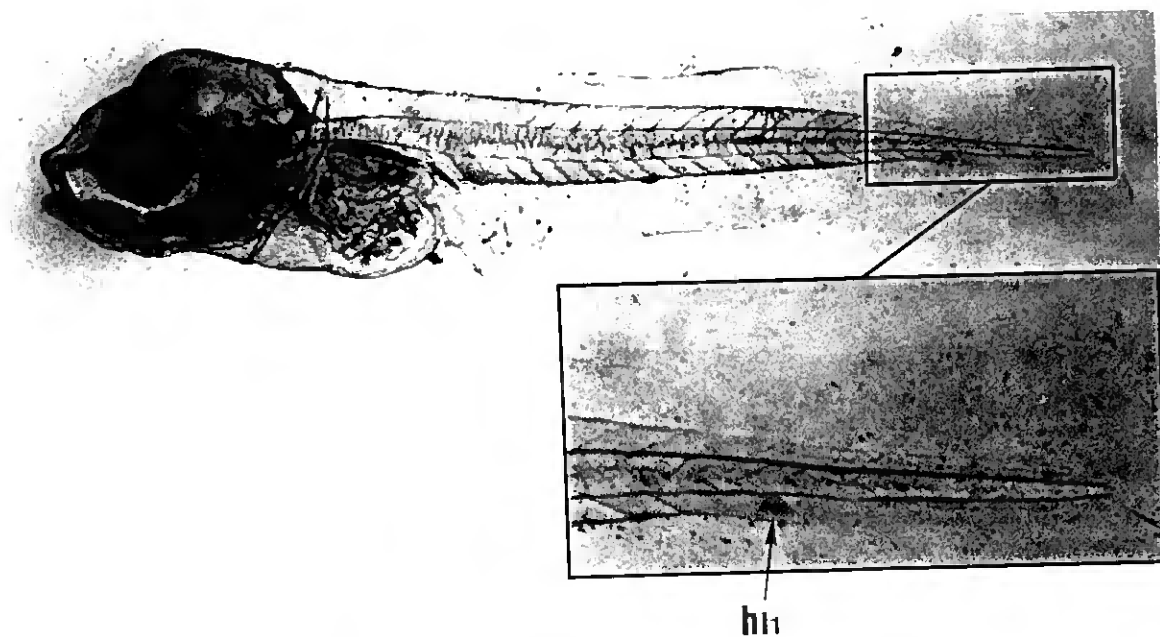


Fig. 17. Exemplar com 4.1 mm NL (7 X). Zona seleccionada (16 X); hi1, hipural 1.

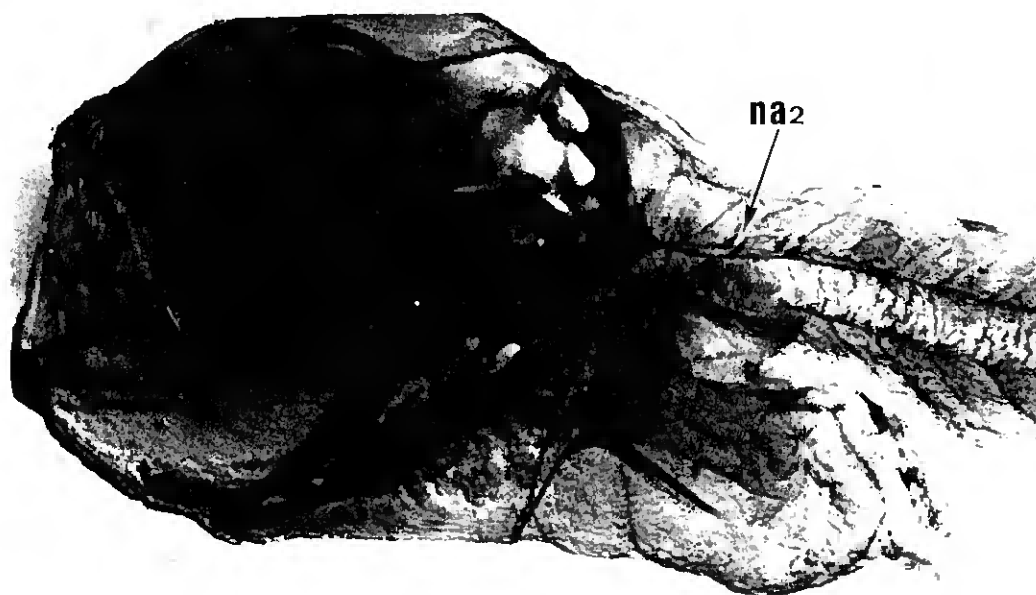


Fig. 18. Exemplar com 4.4 mm NL (12,8 X); na2, arco neural 2.

Em exemplares com 4.9 mm NL, dez arcos hemais cartilagíneos e nove arcos neurais cartilagíneos são visíveis (fig. 19). Verifica-se que cada arco hemal consiste em duas pequenas estruturas cartilagíneas formadas latero-ventralmente, em relação à notocorda, que se unem posteriormente.

Em exemplares com 5.3 mm NL, é possível observar e distinguir todos os arcos neurais cartilagíneos (23), todos os arcos hemais cartilagíneos (13) e duas das quatro parapófises cartilagíneas (fig. 20).

Os 1º, 2º, 3º e 4º arcos neurais formam-se ao nível da notocorda e alongam-se dorsalmente, enquanto que do 5º ao 14º, o aparecimento se dá dorsalmente em relação à espinal medula, alongando-se ventralmente até atingirem a notocorda. Os restantes (15º-23º) seguem o modo de formação dos primeiros quatro.

A formação dos arcos hemais cartilagíneos faz-se no sentido postero-anterior, excepto o 13º que aparece antes dos 10º, 11º e 12º.

Com 5.7-6.0 mm SL, a ossificação começa simultaneamente com a flexão da notocorda na parte terminal posterior (fig. 21). A ossificação ocorre primeiramente no segundo arco neural e continua no sentido posterior. A formação dos *centra* segue o sentido da ossificação dos arcos neurais, sendo no entanto mais rápida do que a destes.

Cerca dos 6.0-6.5 mm SL e depois dos arcos neurais cartilagíneos rodearem a espinal medula, verifica-se o alongamento dorsal das espinhas cartilagíneas, a partir dos arcos neurais. O mesmo acontece com as espinhas hemais cartilagíneas que se alongam ventralmente a partir dos arcos hemais cartilagíneos.

As quatro parapófises, que se conseguem observar por volta dos 7.0- 7.5 mm SL, são constituídas, cada uma, por duas pequenas peças cartilagíneas. A primeira a formar-se é a 4ª, aparecendo sucessivamente e no sentido postero-anterior, a 3ª, a 2ª e a 1ª. A sua ossificação faz-se no mesmo sentido.

Por volta dos 7.1 mm SL, o uróstilo (24º *centrum*) ossifica, na altura em que o 14º/15º *centrum* está formado (fig. 22).

Como referido anteriormente, a ossificação tem início no 2º arco neural e continua no sentido posterior, o mesmo acontecendo com a formação dos *centra*. A ossificação do 1º *centrum* e do 1º arco neural ocorre posteriormente à formação e ossificação dos 6º/7º *centra* e arcos neurais. Por sua vez, os arcos hemais ossificam no sentido antero-posterior e depois dos *centra* respectivos estarem ossificados.

Cerca dos 9.0 mm SL, a totalidade dos *centra* estão formados com a ossificação

do 23º centrum.

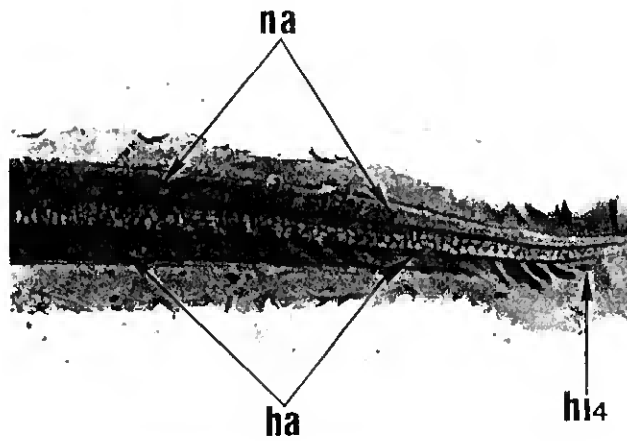


Fig. 19. Exemplar com 4.9 mm NL (5.7 X); ha, arcos hemais; hi4, hipural 4; na, arcos neurais.

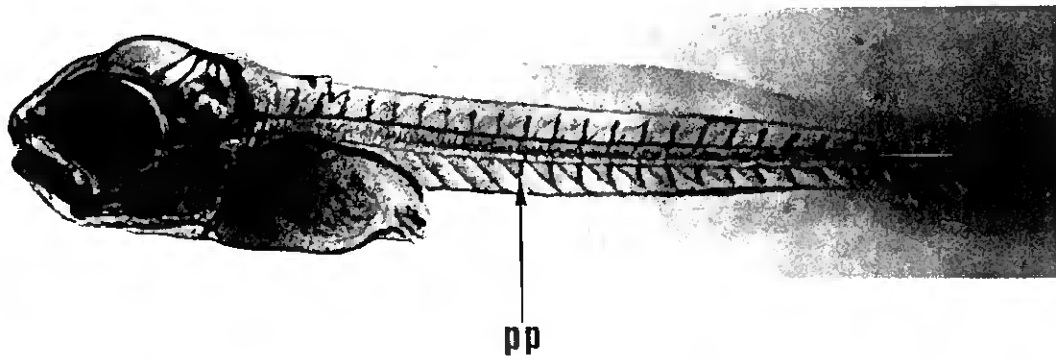


Fig. 20. Exemplar com 5.3 mm NL (4.8 X); pp, parapófise.

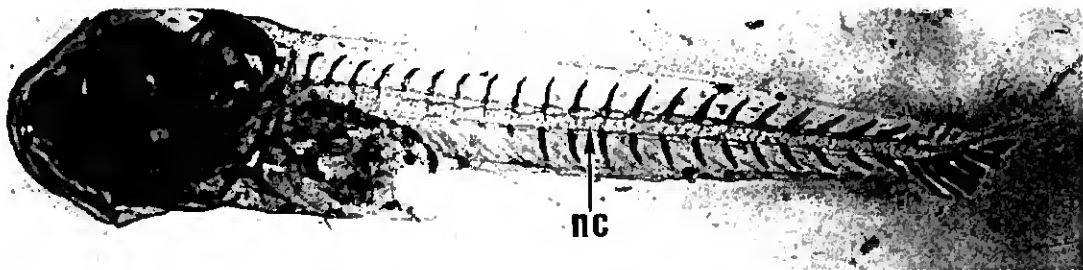


Fig. 21. Exemplar com 5.7 mm SL (4.8 X); início da flexão da notocorda (nc).

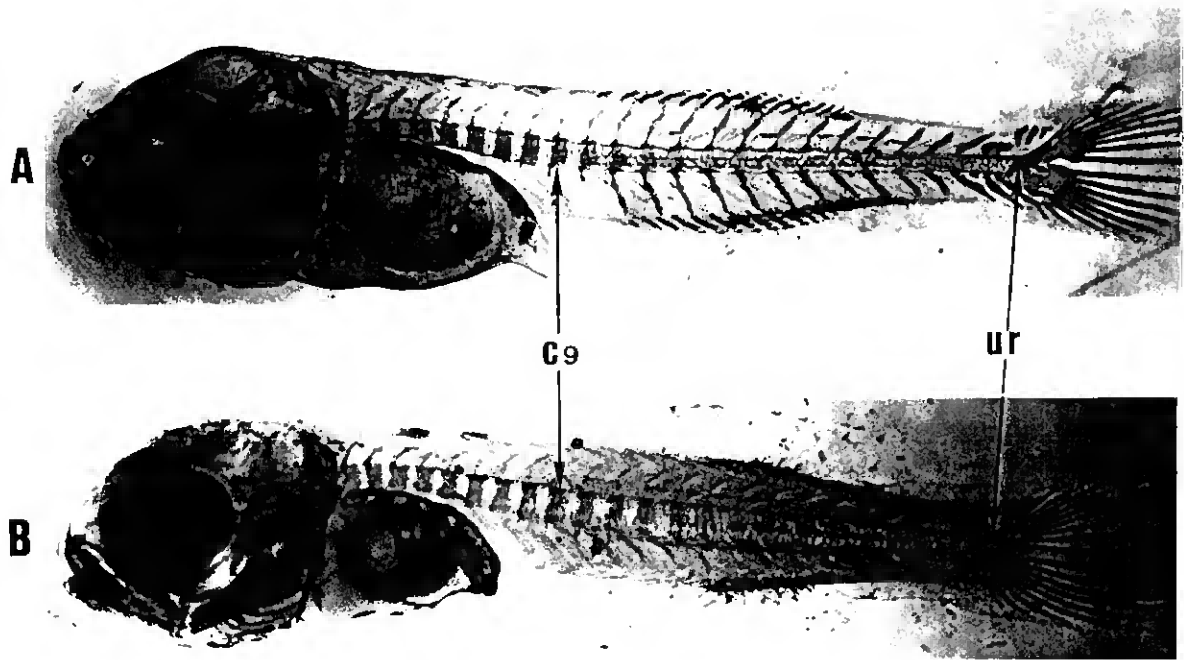


Fig. 22. Exemplares com 7.1 mm SL. A (3.8 X). B, AP (3.5 X); c9, 9º centrum; ur, uróstilo.

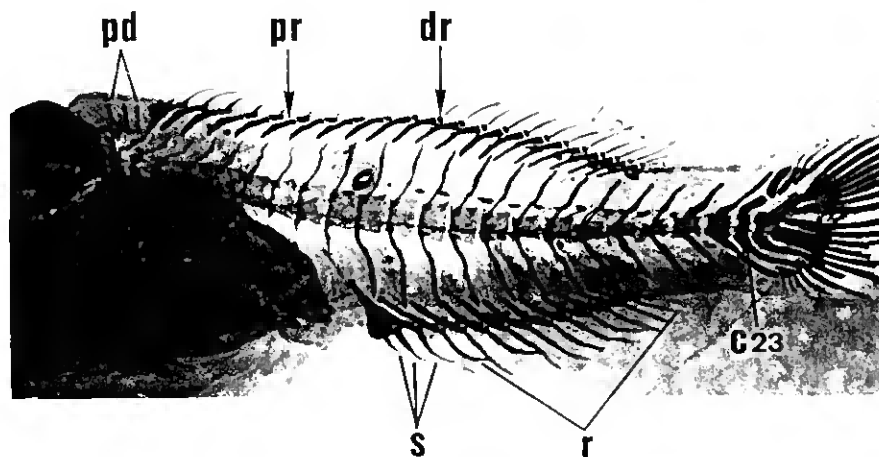


Fig. 23. Exemplar com 9.4 mm SL (2.9 X); c23, 23º centrum; dr, pterigióforo distal; pd, pré-dorsais; pr, pterigióforo proximal; r, raios moles; s, espinhas.

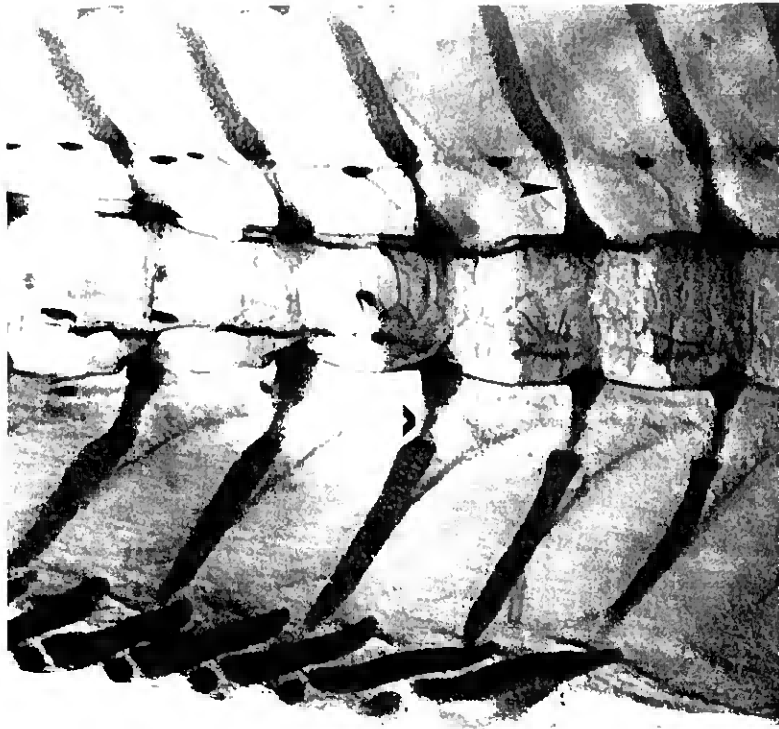
A figura 24 mostra-nos as vértebras 11^a-15^a e a sequência do processo de ossificação dos respectivos arcos neurais e hemais. Os centros de ossificação dos arcos neurais e hemais estão localizados nas zonas médias laterais, por onde passa respectivamente a espinal medula e a veia e artéria caudais. Como as células cartilagineas são substituídas pela matriz óssea, a zona ossificada

torna-se mais fina. Todos os *centra* das vértebras, excepto o 22º e 23º, começam a ser formados na superfície da notocorda à volta da parte basal dos arcos neurais. O processo de ossificação dos *centra* inicia-se nesta zona dorso-lateral e prossegue no sentido ventral, até à sua completa delimitação. Nas 22ª e 23ª vértebras, a formação dos *centra* ocorre primeiramente à volta da parte basal dos respectivos arcos hemais, fazendo-se a ossificação a partir desta zona ventro-lateral na direcção dorsal. Inicialmente cilíndricos, os *centra* alongam-se posteriormente, ao mesmo tempo que vão sofrendo uma constrição mediana. Quando a metade basal das espinhas neurais e hemais está levemente ossificada, as suas pontas começam também a ossificar.

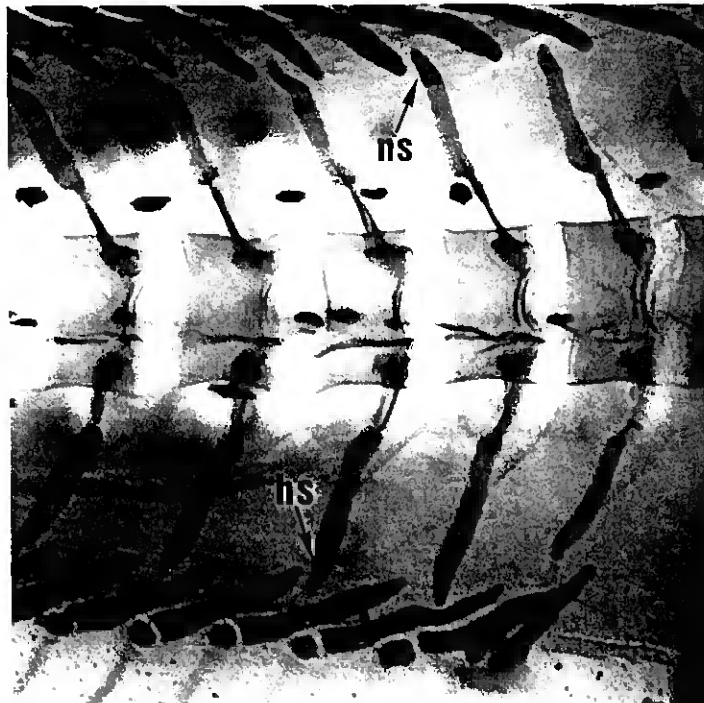
As costelas pleurais cartilagíneas começam a formar-se aos 9.0 mm SL, num sentido antero-posterior, a partir da terceira vertebra, enquanto que a ossificação se inicia aos 10.1 mm SL, prosseguindo num sentido antero-posterior. Aos 16.0 mm SL foi possível observar cinco pares de costelas pleurais ossificados.

Nos exemplares objecto do nosso estudo, verificou-se que as costelas dorsais, iniciam a ossificação, no sentido antero-posterior, por volta dos 10.4 mm SL. Aos 16.0 mm SL estavam presentes três pares ossificados.

A



B



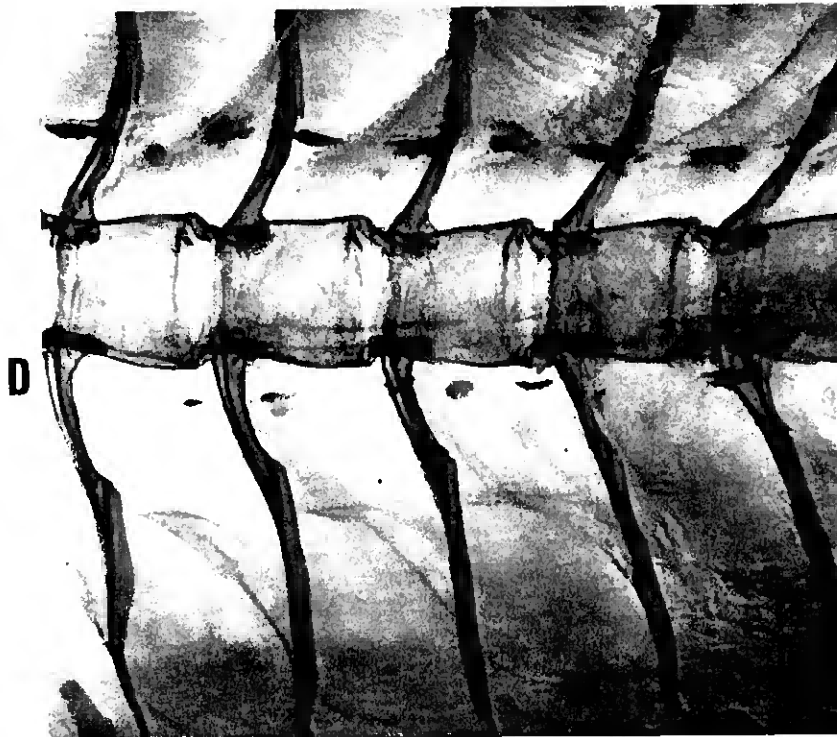
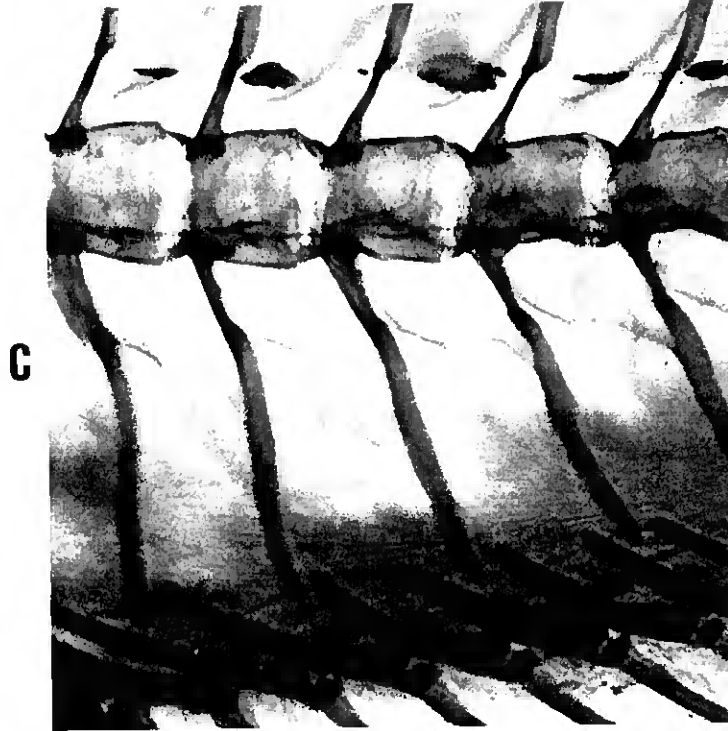


Fig. 24. A - exemplar com 7.9 mm SL (16 X). B - exemplar com 8.6 mm SL (12.8 X). C - exemplar com 9.4 mm SL (12.8 X). D - exemplar com 11.4 mm SL (12.8 X); hs, espinha hemal; ns, espinha neural; ►, centro de ossificação do arco neural; ⤵, centro de ossificação do arco hemal.

5.2. BARBATANA CAUDAL E ESTRUTURAS ANEXAS

Em larvas com 3.1-3.8 mm NL, não se observam elementos caudais, excepto a notocorda direita (fig. 25).

Aos 4.1 mm NL, o complexo caudal inicia o seu desenvolvimento com o aparecimento de um pequeno botão cartilágneo ventral (hipural 1) (fig. 17).

O parahipural e os hipurais 2 e 3 cartilágneos formam-se, sucessivamente, por volta dos 4.4 mm NL (fig. 26) e o hipural 4 aparece aos 4.9 mm NL (fig. 19).

Aos 5.7 mm SL, o hipural 5 cartilágneo começa a formar-se. Dos três epurais, o central aparece como cartilagem aos 4.9 mm NL e o anterior e o posterior condricam por volta dos 5.1 mm NL. Nos exemplares em que os epurais já se tinham formado, verificou-se que mais de 30% apresentavam quatro epurais.

Nas fases iniciais, não se observam junções cartilágneas entre o parahipural e os hipurais 1 e 2, mas posteriormente os últimos dois elementos fundem-se na parte basal e subseqüentemente juntam-se ao parahipural. Posteriormente e quando a ossificação está completa, verifica-se que todas estas estruturas se voltam a separar.

Os rudimentos dos raios moles segmentados principais começam a formar-se e ossificam do centro para a periferia, por volta dos 5.1 mm NL. A totalidade do conjunto (9+8) completa-se por volta dos 7.0 mm SL. A notocorda começa a flexão cerca dos 5.7-6.0 mm SL (fig. 21).

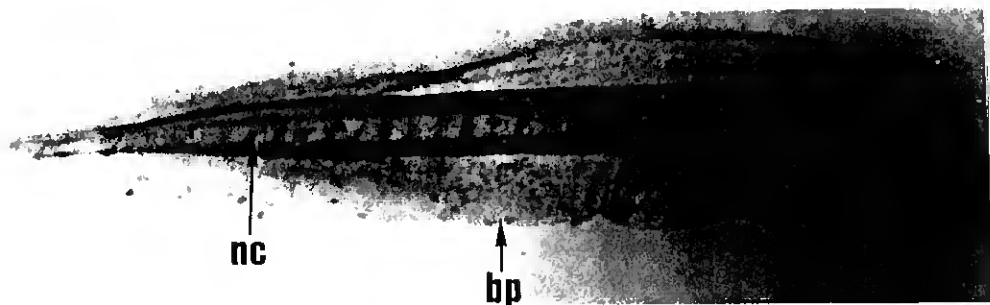


Fig. 25. Exemplar com 3.4 mm NL (8 X); bp, barbatana primordia; nc, notocorda.

A ossificação do parahipural e hipurais 1 a 4 começa aos 7.1 mm SL, ao mesmo tempo da formação do uróstilo. O hipural 5 somente começa a ossificação por volta dos 9.7 mm SL. Aos 14.7 mm SL, todos os três epurais estão ossificados.

O uroneural 1 (1º par) começa a ser formado aos 10.4 mm SL, enquanto que o uroneural 2 (2º par) aparece aos 16.0 mm SL.

Aos 16.0 mm SL, todos os elementos do complexo caudal, excepto a cartilagem acessória, estão ossificados. São visíveis dezassete raios moles segmentados. 1

Nas nossas observações, foi possível distinguir cinco Ac. A primeira apareceu por volta dos 6.1 mm SL, entre as 12ª e 13ª espinhas hemais, observando-se uma outra pouco depois, situada entre a 13ª espinha hemal e o parahipural. A terceira, situada posteriormente à extremidade superior do hipural 5, forma-se por volta dos 8.1 mm SL e, pouco depois, a quarta que se localiza numa zona posterior à parte inferior da 13ª espinha hemal. Aos 14.7 mm SL, na zona anterior à 12ª espinha hemal, foi possível reconhecer uma quinta Ac.

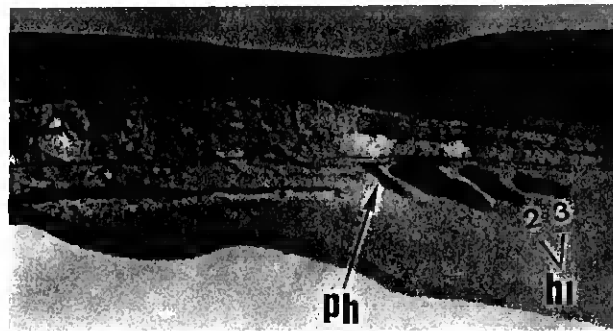


Fig. 26. Exemplar com 4.4 mm NL (16 X); hi, hipurais; ph, parahipural.

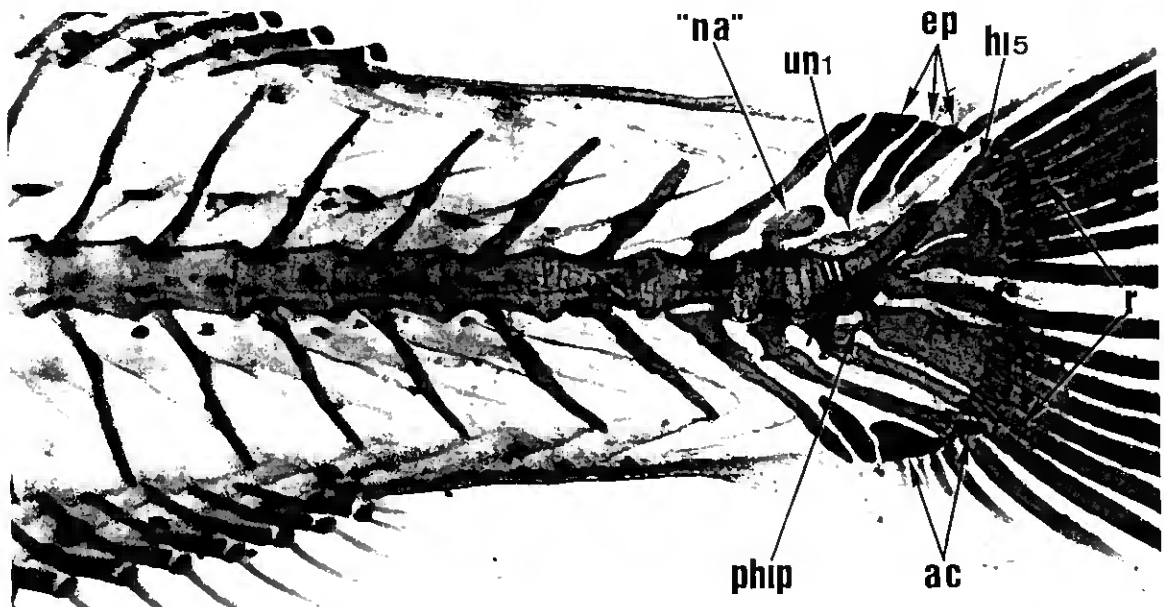


Fig. 27. Exemplar com 11.6 mm SL (8 X). Aspecto do complexo caudal; ac, cartilagens acessórias; ep, epurais; hi5, hipural 5; "na", arco neural especializado; phip, parahipurapófise; r, raios moles segmentados; un1, uroneural 1; ur, uróstilo.

5.3. BARBATANAS PEITORAIS E CINTURA PEITORAL (ESCAPULAR)

Em exemplares com 3.1 mm NL, já se observa o *cleitrum* ossificado, em forma de agulha e um conjunto cartilágneo formado pela placa da barbatana e pelo complexo escápula-coracóide (fig. 28).

Aos 4.7-5.1 mm NL, a placa cartilágnea da barbatana apresenta uma fenda na região média anterior e encontra-se separada do complexo cartilágneo escápula-coracóide (fig. 29). A parte anterior do coracóide alonga-se gradualmente. A escápula cartilágnea alonga-se dorsalmente, encerrando no seu interior o orifício escapular.

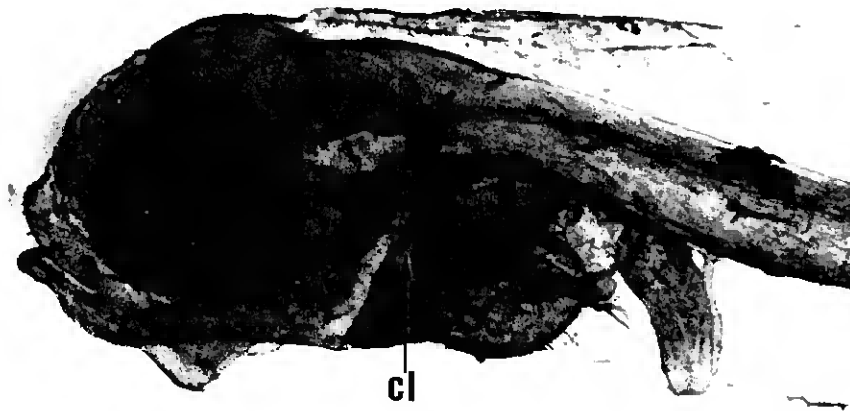


Fig. 28. Exemplar com 3.1 mm NL, AP (16 X); cl, *cleitrum*.



Fig. 29. Exemplar com 4.9 mm NL (16 X); cl, *cleitrum*; co-sca, complexo escápula-coracóide; fp, placa da barbatana; ►, fenda na placa da barbatana.

Por volta dos 5.7 mm SL, visualiza-se o *pós-cleitrum* inferior ossificado e começam a aparecer os primeiros distais radiais cartilagueos, bem como os primeiros raios moles, dos 15 que formam a barbatana que ossificam dorso-ventralmente.

Entre os 6.6 e os 7.1 mm SL, aparecem a segunda e terceira fendas na placa cartilaguea da barbatana, respectivamente em posição superior e inferior à primeira e observam-se sete raios ossificados. Visualiza-se o *supracleitrum* e o pós-temporal ossificados.

Cerca dos 7.4-7.9 mm SL, é possível observar o *pós-cleitrum* superior ossificado.

Aos 7.9 mm SL, a placa cartilaguea da barbatana está completamente dividida por três fendas, em quatro "actinosts", e observam-se doze/treze distais radiais cartilagueos e dez raios ossificados (fig. 30).

Aos 8.6 mm SL, todos os quinze distais radiais cartilagueos estão formados.

O coracóide e a escápula começam a ossificar simultaneamente por volta dos 10.0 mm SL, enquanto que os "actinosts" iniciam a ossificação aos 10.5 mm SL, num sentido dorso-ventral.



Fig. 30. Exemplar com 7.9 mm SL (8 X); act, "actinost"; bt, *basipterigium*; dr, radial distal; pot, pós-temporal; r, raio mole; suc, *supracleitrum*.

Em exemplares com 11.4 mm SL, os supratemporais inferior e superior estão ossificados.

Aos 14.7 mm SL (fig. 31), observam-se todos os quinze raios ossificados e todo o complexo das barbatanas peitorais está praticamente ossificado, excepto os quinze distais radiais, o mesmo se verificando em exemplares de 16.0 mm SL.



Fig. 31. Exemplar com 14.7 mm SL (3.5 X). O complexo das barbatanas peitorais, com excepção dos radiais distais, está praticamente ossificado. Nas barbatanas ventrais todo o conjunto está ossificado; bt, *basipterigium*.

5.4. BARBATANAS DORSAL E ANAL E ESTRUTURAS DE SUPORTE

As barbatanas dorsal e anal da dourada, tal como em outros teleósteos, são suportadas por um conjunto de peças (pterigióforos) que estabelecem a ligação entre as espinhas/raios das barbatanas e o esqueleto axial. Os pterigióforos distais estão em contacto directo com as espinhas/raios da barbatana, os pterigióforos proximais estabelecem o contacto à distância com as espinhas neurais/hemais e os pterigióforos médios situam-se numa zona contígua à extremidade mais exterior dos pterigióforos proximais.

Aos 6.5-7.0 mm SL, observam-se, dorsalmente, dez pterigióforos proximais cartilagíneos situados entre a 11^a e a 17^a espinhas neurais e acima destas, e ventralmente, oito pterigióforos proximais cartilagíneos situados entre a 2^a e a

7ª espinhas hemais e abaixo destas. Posteriormente, aparecem em posição anterior, a partir da 2ª espinha neural e acima desta, outro grupo de pterigióforos proximais dorsais cartilagíneos (fig. 32). A formação dos restantes pterigióforos proximais dorsais cartilagíneos faz-se nos sentidos anterior e posterior. Em relação aos restantes pterigióforos proximais ventrais cartilagíneos, a sua formação faz-se nos sentidos anterior e posterior a partir do grupo inicial.

Aos 7.0-7.7 mm SL, são visíveis todos os pterigióforos proximais e distais cartilagíneos, tanto dorsal como ventralmente. É ainda possível observar os três pré-dorsais cartilagíneos. A sequência de formação dos pterigióforos distais ventrais e dorsais cartilagíneos segue o modelo descrito para os pterigióforos proximais.

Cerca dos 7.9-8.6 mm SL, inicia-se a ossificação dos rudimentos das espinhas e raios das barbatanas dorsal e anal. Aos 9.4 mm SL observam-se todas as espinhas (11) e raios moles (13) da barbatana dorsal ossificados, o mesmo se passando com as três espinhas e os doze raios moles da barbatana anal (fig. 23).

O início da ossificação dos pterigióforos proximais dorsais e ventrais cartilagíneos observa-se apenas aos 10.4 mm SL, fazendo-se esta, nos dois casos, no sentido antero-posterior.

A ossificação dos pterigióforos distais dorsais e ventrais cartilagíneos, faz-se também no sentido antero-posterior, iniciando-se por volta dos 11.3 mm SL (fig. 33).

Aos 12.1 mm SL, os pré-dorsais estão ossificados (fig. 34).

Relativamente aos pterigióforos médios dorsais e ventrais, em exemplares até aos 16.0 mm SL, não nos foi possível visualizar a sua presença e/ou ossificação.

Nos maiores exemplares estudados de *S. aurata* (16.0 mm SL), verificou-se que, dorsalmente, existem três ossos pré-dorsais que não suportam espinhas ou raios, 22 pterigióforos proximais, igual nº de pterigióforos distais, onze espinhas e treze raios moles. Ventralmente, podem observar-se 14 pterigióforos proximais, igual nº de pterigióforos distais, três espinhas e doze raios moles.

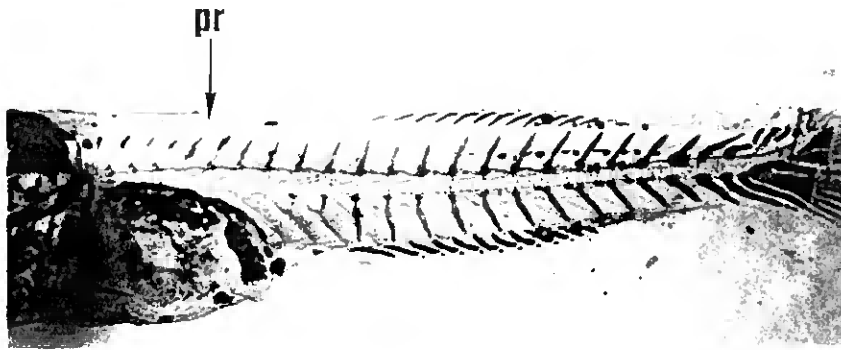


Fig. 32. Exemplar com 6.7 mm SL (3.8 X). De notar o aparecimento de um 2º grupo de pterigióforos proximais dorsais, em posição anterior; pr, pterigióforo proximal do 2º grupo.

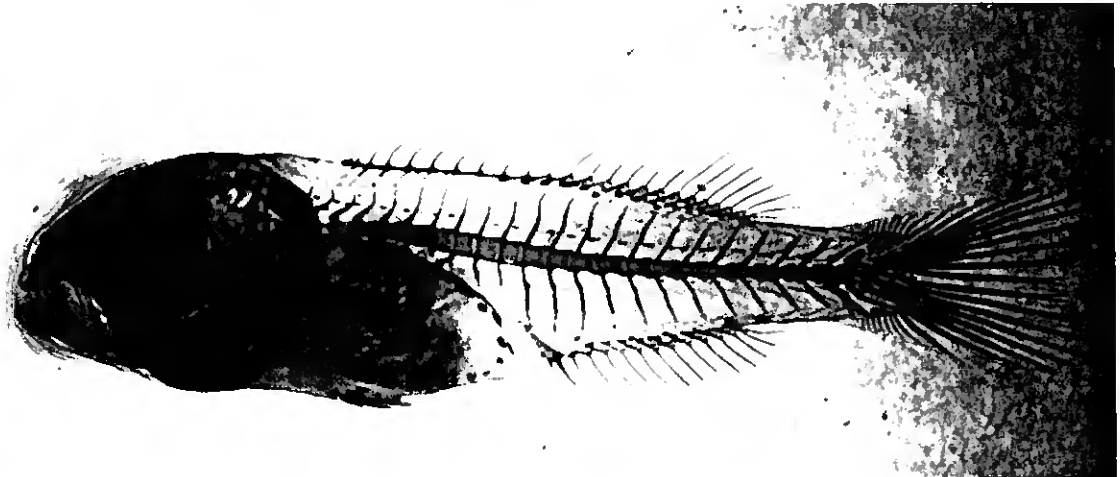


Fig. 33. Exemplar com 11.3 mm SL (2.2 X). Fase inicial da ossificação dos pterigióforos proximais e distais.

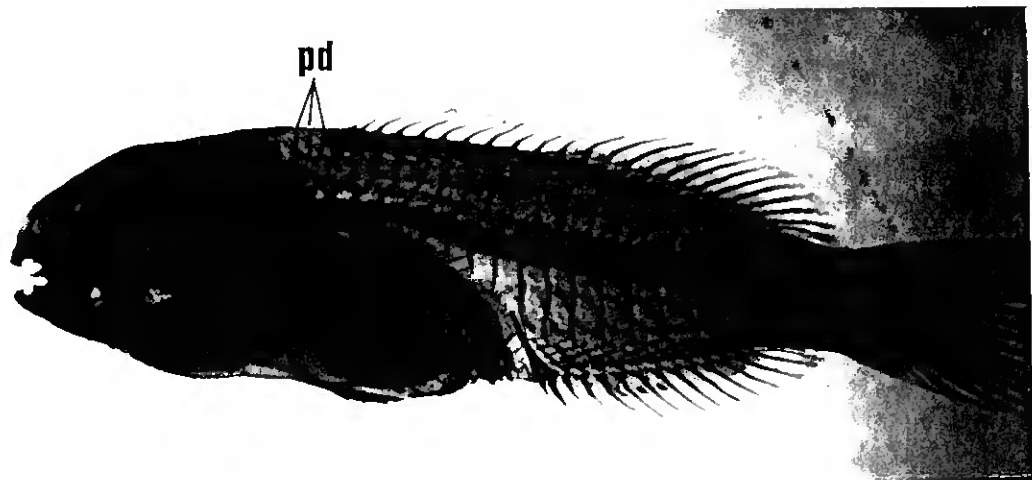


Fig. 34. Exemplar com 12.1 mm SL, AP (1.9 X). Fase mais adiantada da ossificação dos pterigióforos proximais e distais. Os três pré-dorsais (pd) estão ossificados.

5.5. BARBATANAS VENTRAIS (PÉLVICAS) E CINTURA PÉLVICA

Aos 7.9 mm SL, observa-se o *basipterigium* cartilágneo. Este vai alongar-se no sentido anterior em direcção ao *cleitrum* (fig. 30).

Com 9.4 mm SL, o *basipterigium* cartilágneo continua a alongar-se em direcção ao *cleitrum* e visualizam-se os raios em início de ossificação (fig. 35).

Em exemplares com 11.4 mm SL, o *basipterigium* cartilágneo está muito próximo do *cleitrum*, observando-se que a espinha e os cinco raios moles estão ossificados (fig. 36).

Cerca dos 13.6 mm SL, observa-se que o *basipterigium* já atingiu o *cleitrum*. Com excepção do primeiro terço anterior e da região basal, está ossificado (fig. 37).

Aos 14.7 mm SL, o *basipterigium* está completamente ossificado (fig. 31).

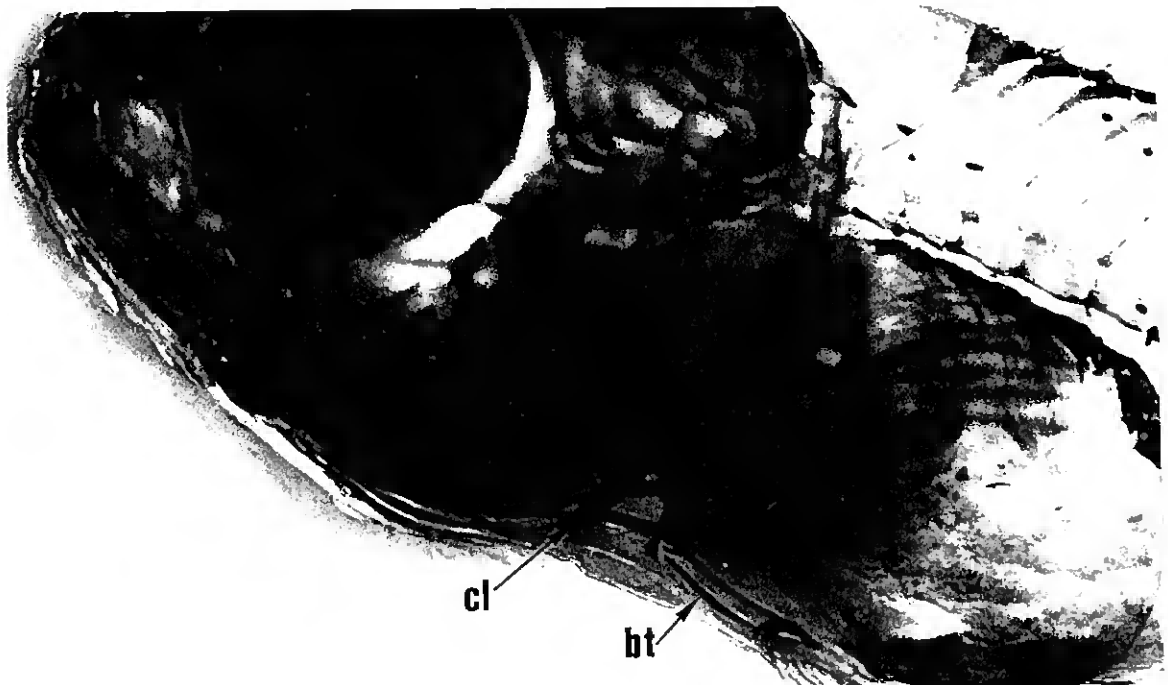


Fig. 35. Exemplo com 9.4 mm SL (7 X); bt, *basipterigium*; cl, *cleitrum*.

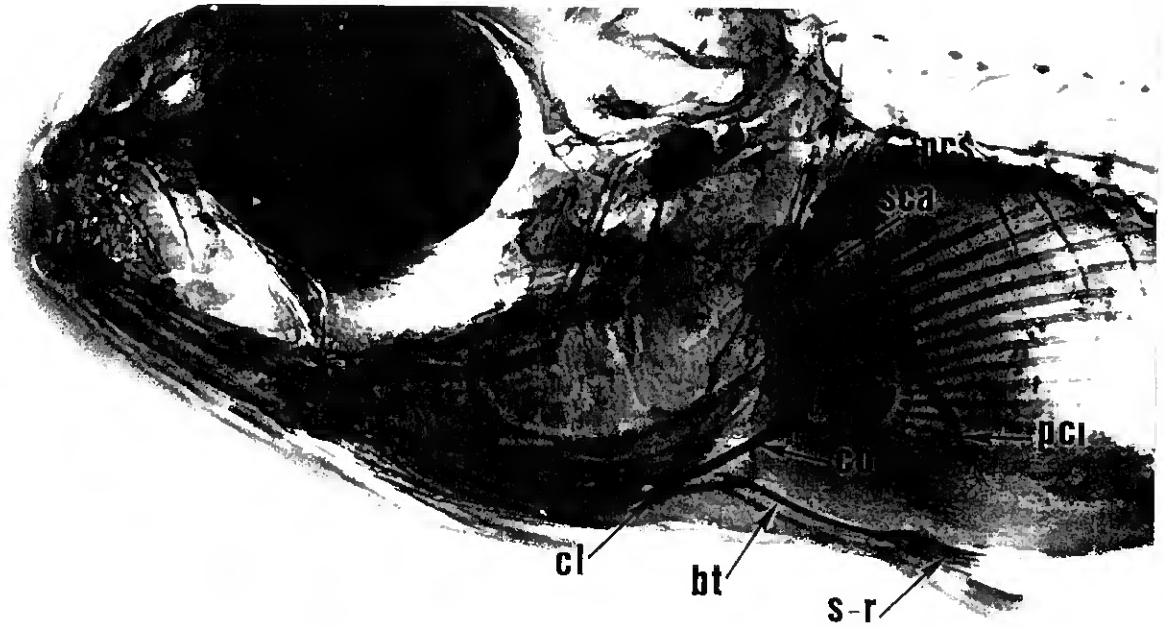


Fig. 36. Exemplar com 11.4 mm SL (5.7 mm SL); bt, *basipterigium*; cl, *cleitrum*; co, *coracóide*; pci, *pós-cleitrum inferior*; pcs, *pós-cleitrum superior*; sca, *escápula*; s-r, *conjunto espinha-raios moles*.



Fig. 37. Exemplar com 13.6 mm SL (3.8 X).

As tabelas 3 e 4 mostram, respectivamente, a sequência do aparecimento da cartilagem e do osso e os tipos de ossificação verificados nos exemplares objecto do nosso estudo.

O gráfico da fig. 38, baseado na tabela 3, evidencia a relação existente entre o nº de estruturas ossificadas (valor cumulativo) e o NL/SL.

Tabela 3. Sequência do aparecimento das estruturas cartilagueas e ósseas.

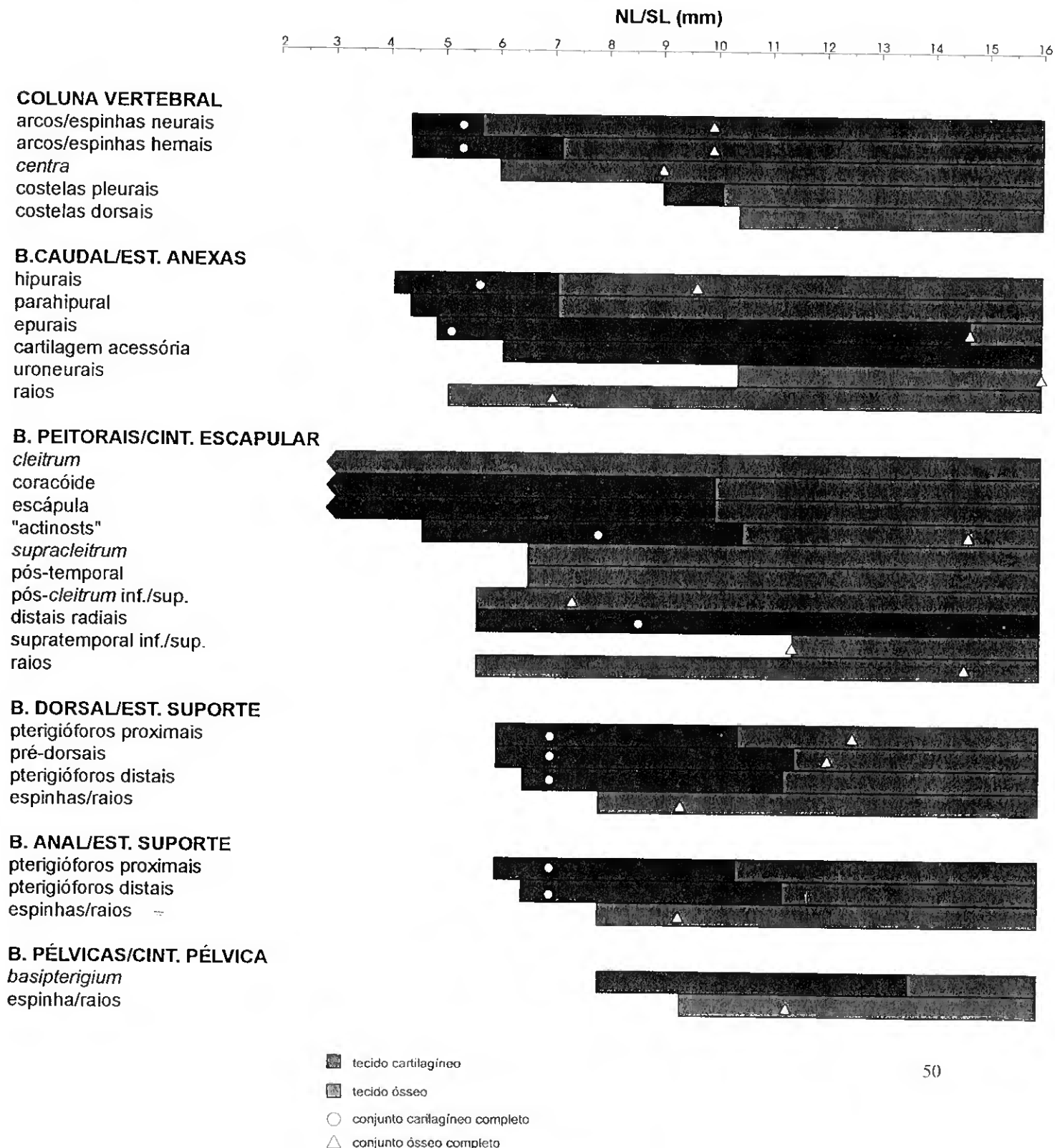



Tabela 4. Tipos de ossificação. Os espaços sombreados  representam o tipo de ossificação para cada estrutura.

	ossificação acondral	ossificação endocondral
COLUNA VERTEBRAL		
arcos/ espinhas neurais		
arcos/ espinhas hemais		
<i>centra</i>		
costelas pleurais		
costelas dorsais		
B. CAUDAL/EST. ANEXAS		
hipurais		
parahipural		
epurais		
cartilagem acessória		
uroneurais		
raios		
B. PEITORAIS/CINT. ESCAP.		
<i>cleitrum</i>		
coracóide		
escápula		
"actinosts"		
<i>supracleitrum</i>		
pós-temporal		
<i>pós-cleitrum</i> infer./super.		
distais radiais		
supratemporal infer./super.		
raios		
B. DORSAL/EST. SUPORTE		
pterigióforos proximais		
pré-dorsais		
pterigióforos distais		
espinhas/raios		
B. ANAL/EST. SUPORTE		
pterigióforos proximais		
pterigióforos distais		
espinhas/raios		
B. PÉLVICAS/CINT. PÉLVIC.		
<i>basipterigium</i>		
espinha/raios		

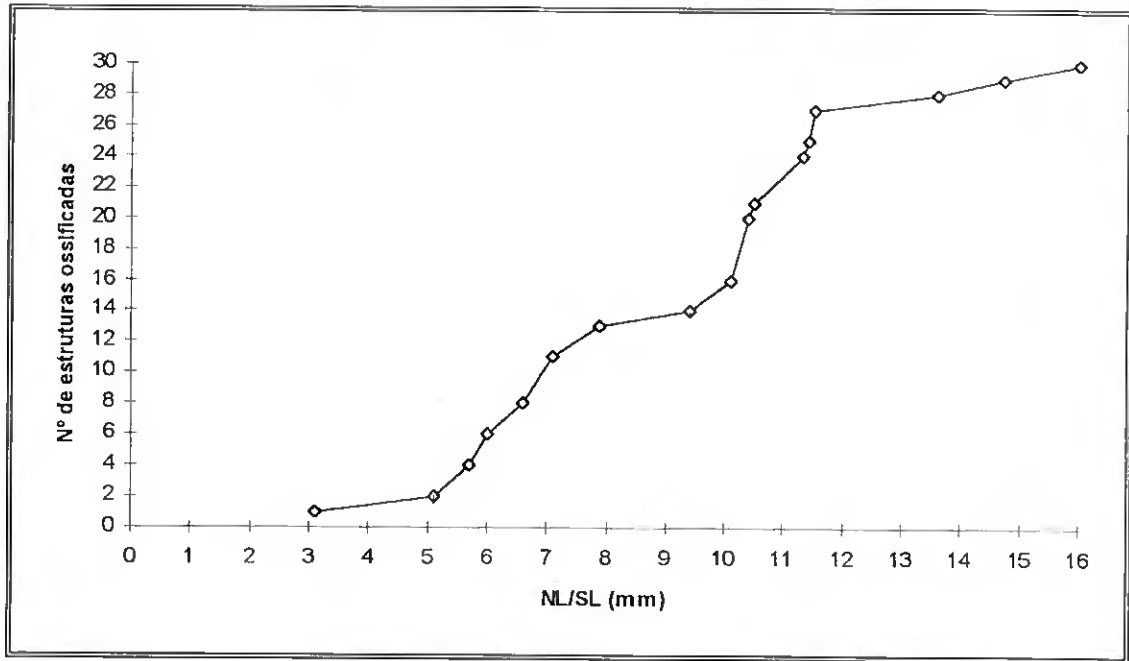


Fig. 38. Gráfico evidenciando a relação entre o nº de estruturas ossificadas (valor cumulativo) e o NL/SL.

VI. DISCUSSÃO

Alguns comentários se podem fazer acerca da ontogenia das estruturas cartilagíneas e ósseas em *S. aurata*, em comparação com a literatura conhecida em outros teleósteos (o anexo 3 mostra-nos a respectiva posição sistemática).

A sequência das formações cartilagíneas dos arcos neurais e hemais ao longo da notocorda apresenta consideráveis diferenças. Segundo Gwyn (1940), em *Clupea pallasii*, os arcos neurais e hemais iniciam o seu desenvolvimento num sentido postero-anterior a partir do penúltimo *centrum* e, pouco depois, num sentido antero-posterior a partir da zona posterior da cabeça. Por sua vez Potthoff & Kelley (1982) e Potthoff *et al.* (1986), em *Xiphias gladius*, observaram que, tanto os arcos neurais como os arcos hemais, se formam sucessivamente num sentido antero-posterior. Em *Anisotremus virginicus*, Potthoff *et al.* (1984) referem o aparecimento dos arcos neurais nas partes anterior e central da notocorda e dos arcos hemais na zona central da notocorda. Em *Scombrolabrax heterolepis*, os arcos neurais desenvolvem-se a partir da parte mais anterior da notocorda e da metade posterior da notocorda, enquanto que os arcos hemais se desenvolvem numa zona da notocorda correspondente à parte central da futura barbatana anal (Potthoff *et al.*, 1986). Balart (1995) observa que em *Engraulis japonicus*, os arcos neurais e hemais surgem primeiramente próximo da extremidade posterior da notocorda, fazendo-se o aparecimento dos restantes no sentido postero-anterior.

Em *Archosargus rhomboidalis*, Houde & Potthoff (1976) descrevem o aparecimento dos primeiros quatro arcos neurais na zona mais anterior da notocorda e do primeiro arco hemal ao nível do 7º/8º *centrum*, enquanto que Matsuoka (1987), em *Pagrus major*, refere o desenvolvimento inicial do 2º e 3º arcos neurais na zona dos 2º e 3º *centra* e dos 2º ao 10º arcos hemais, ao nível respectivamente dos 11º ao 19º *centra*.

A sequência da formação cartilagínea dos arcos neurais e hemais em *S. aurata* é fundamentalmente semelhante com o verificado em *A. virginicus* (Potthoff *et al.*, 1984), *S. heterolepis* (Potthoff *et al.*, 1986) e no sparídeo *A. rhomboidalis* (Houde & Potthoff, 1976) e praticamente coincidente com o descrito para o sparídeo *P. major* (Matsuoka, 1987).

Em *S. aurata*, tal como em *P. major* (Matsuoka, 1987), as células cartilagíneas dos futuros arcos neurais começam por aparecer em diferentes regiões, como p. ex. em cima da notocorda ou dorsalmente à espinal medula, enquanto que as parapófises e os arcos hemais cartilagíneos surgem por baixo da notocorda. Há, no entanto, a registar pequenas diferenças relativamente à deposição e aparecimento das células cartilagíneas dos arcos neurais. Em *S. aurata*, observou-se a formação do 1º ao 4º e do 15º ao 23º arcos neurais sobre a

notocorda, enquanto que do 5º ao 14º o seu aparecimento se dá dorsalmente em relação à espinal medula. Por sua vez, em *P. major* (Matsuoka, 1987), é referida uma formação sobre a notocorda do 1º, 2º e 3º arcos neurais, um aparecimento dorsal em relação à espinal medula do 4º ao 14º arcos neurais e uma formação simultânea sobre a notocorda e dorsalmente em relação à espinal medula do 15º ao 18º arcos neurais.

Ao contrário do referido para *A. rhomboidalis* (Houde & Potthoff, 1976), *X. gladius* (Potthoff et al., 1986), *Thunnus atlanticus* (Potthoff et al., 1986), *Scomber japonicus* (Kramer, 1960; Potthoff et al., 1986) e *E. japonicus* (Balart, 1995), em *P. major* (Matsuoka, 1987) e nas nossas observações em *S. aurata*, a ossificação inicia-se pelo 2º arco neural, continuando posteriormente; o mesmo se verificando com a formação dos *centra*, com excepção do 24º que ossifica quando o 14º/15º *centrum* está formado [16º/17º em *P. major* (Matsuoka, 1987)]. A ossificação do 1º *centrum* e do 1º arco neural ocorre posteriormente à formação e ossificação dos 6º/7º *centra* e arcos neurais 8º/9º em *P. major* (Matsuoka, 1987). Em oposição ao descrito em *P. major* (Matsuoka, 1987) e em *A. rhomboidalis* (Houde & Potthoff, 1976), observámos que, em *S. aurata*, com excepção dos primeiros 6/7 *centra*, a ossificação dos *centra* é relativamente mais rápida do que a dos arcos neurais, o mesmo se verificando também em *T. atlanticus* (Potthoff et al., 1986). Em *A. rhomboidalis* (Houde & Potthoff, 1976), *A. virginicus* (Potthoff et al., 1984) e *T. atlanticus* (Potthoff et al., 1986), é sugerido que o uróstilo e os *centra* pré-urais 2 e 3 (respectivamente 24º, 23º e 22º *centra*) se formam num sentido postero-anterior. Tal como o observado em *P. major* (Matsuoka, 1987), em *S. aurata* verificámos que, excepto o uróstilo, os *centra* pré-urais 2 e 3 aparecem num sentido antero-posterior.

O processo de formação dos *centra* cilíndricos ao redor da notocorda apresenta, também, algumas diferenças consoante as espécies. Nos Perciformes, *S. japonicus* (Potthoff et al., 1986) e *T. atlanticus* (Potthoff et al., 1986), a ossificação dos *centra* começa simultaneamente nas duas zonas que circundam as partes basais dos arcos neurais e hemais, e posteriormente estes rudimentos dos *centra* fundem-se nas partes laterais da notocorda. Nas nossas observações e como já referido no capítulo anterior, todos os *centra* das vértebras, excepto o 22º e 23º (respectivamente *centra* pré-urais 3 e 2), começam a ser formados na superfície da notocorda, à volta da parte basal dos arcos neurais. O processo de ossificação dos *centra* inicia-se nesta zona dorso-lateral e prossegue no sentido ventral, até à sua completa delimitação. Nos 22º e 23º *centra* a formação ocorre, primeiramente, à volta da parte basal dos respectivos arcos hemais, fazendo-se a ossificação a partir desta zona ventro-lateral na direcção dorsal. Inicialmente cilíndricos, os *centra*, alongam-se posteriormente, ao mesmo tempo que vão sofrendo uma constrição mediana. Um processo em tudo idêntico ao, por nós, verificado em *S. aurata*, é referido para *P. major* (Matsuoka, 1987).

Kohno *et al.* (1983) referem que o uróstilo de *P. major* se origina a partir de dois elementos separados, provavelmente os *centra* ural 1 e 2. Nas nossas observações, no entanto, essa evidência não foi detectada durante a ontogenia de *S. aurata* e o uróstilo surge como um elemento independente, desde o seu aparecimento inicial. Igual constatação foi efectuada por Matsuoka (1987) em *P. major* e por Balart (1985) em *Paralichthys olivaceus*.

Em muitos teleósteos, como p. ex. *C. pallasii* (Gwin, 1940), *A. rhomboidalis* (Houde & Potthoff, 1976), *A. virginicus* (Potthoff *et al.*, 1984), *P. olivaceus* (Balart, 1985), *P. major* (Matsuoka, 1987), *S. japonicus* (Potthoff *et al.*, 1986), *Trachurus japonicus* (Balart, 1990), *Clarias batrachus* (Fujita, 1992 a), *Oryzias latipes* (Fujita, 1992 b), *Tilapia sparrmanii* (Fujita, 1994), *Cololabis saira* (Fujita & Oozeki, 1994), *E. japonicus* (Balart, 1995) e *Misgurnus anguillicaudatus* (Ichiyangi & Fujita, 1995), é indicado que as primeiras estruturas a aparecer no esqueleto axial se localizam na extremidade caudal sob a forma de pequenos botões cartilágineos (hipurais e parahipural).

Em *S. aurata*, Kiriakos *et al.* (1994), descrevem o aparecimento dos hipurais 1 e 2 entre os 5.7-6.0 mm TL. Nas nossas observações verificámos que o hipural 1 é a primeira estrutura a condrificar por volta dos 4.1 mm NL, aparecendo posteriormente o parahipural e o hipural 2, aos 4.4 mm NL. Em espécies próximas verifica-se uma quase total concordância, com o que constatámos em *S. aurata*, relativamente ao aparecimento das primeiras estruturas cartilágineas do esqueleto axial. Assim, no sparídeo *A. rhomboidalis*, Houde & Potthoff (1976), observaram larvas com 3.4 mm NL que apresentavam os hipurais 1 e 2 e o parahipural. Por sua vez, Matsuoka (1987) verificou que, no sparídeo *P. major*, o hipural 1 era o primeiro a condrificar, aos 4.5 mm TL (4.2/4.3 mm NL), aparecendo posteriormente o parahipural e o hipural 2.

A flexão da notocorda, em teleósteos, é um acontecimento que apresenta variações pouco consideráveis relativamente ao momento do seu início (tabela 5).

De salientar a semelhança entre os valores descritos para *P. major* (Matsuoka, 1987) e os observados por nós, em *S. aurata*, e a discrepância com o referido em *S. aurata* por Kiriakos *et al.* (1994).

Relativamente ao observado por Kiriakos *et al.* (1994) e por nós, as diferenças registadas poderão ser fruto tanto da qualidade dos ovos como das diferentes condições de cultivo (temperatura e salinidade, respectivamente, de 22 ± 1 °C e 41 ‰ e de 18 ± 1 °C e 36 ± 1 ‰).

No que diz respeito às outras espécies, não é sugerida qualquer relação evidente, quer em relação ao tamanho final dos exemplares, quer em relação ao tipo e desenvolvimento dos ovos.

Tabela 5. Resumo comparativo sobre algumas estruturas e acontecimentos nos teleósteos referidos (* - Quéro et al., 1990; s.d. - sem dados).

espécie	nº de ossos pré-dorsais	total de vértebras	nº de epurais	nº de uroneurais	hipural 5 presente/ausente unido/separado	nº de cartilagens acessórias	início da flexão	autor(es)	* comprimento
<i>A. virginicus</i>	3	26	3	4	presente separado	6	5.7 mm SL	Pothoff et al. (1984)	normal - 15-20 cm SL
<i>A. rhomboidalis</i>	3	24	3	4	presente separado	-	4.2/4.4 mm NL	Houde & Pothoff (1976)	s. d.
<i>C. bafrachus</i>	-	-	1	2	presente separado	0	5.2 mm NL	Fujita (1992 a)	s. d.
<i>C. saira</i>	-	-	2	2	presente separado	0	< 5.5 mm SL	Fujita & Oozeki (1994)	≤ 50 cm SL
<i>E. japonicus</i>	12	43-47	2	6	6 hipurais	6	6.2/6.9 mm NL	Balart (1995)	≤ 20 cm (normal - 12, 15 cm)
<i>M. anguillifcaudatus</i>	-	-	1	2	4 hipurais	0	6.4 mm NL	Ichivanagi & Fujita (1995)	s. d.
<i>O. latipes</i>	-	-	2	2	presente unido c/ hipurais 3 e 4	1	48 mm NL	Fujita (1992 b)	s. d.
<i>P. major</i>	3	24	3	4	presente separado	8	6.0 mm TL	Matsuoka (1985)	≤ 70 cm SL (normal - 25-35 cm SL)
<i>P. olivaceus</i>	-	-	2	0	presente separado	2	7.6 mm SL	Balart (1985)	≤ 50 cm
<i>S. sarda</i>	0	51	2	2	presente separado	-	7.5 mm NL	Pothoff et al. (1986)	≤ 90 cm FL (normal - 50 cm FL)
<i>S. japonicus</i>	0	31	2	2	presente unido c/ uroneural mais próximo	-	< 5.9 mm SL	Pothoff et al. (1986)	≤ 50 cm FL (normal - ≤ 30 cm FL)
<i>S. cavalla</i>	0	41-53	2	2	presente separado	-	5.5 mm NL	Pothoff et al. (1986)	35-46 cm FL
<i>S. heterolepis</i>	0	30	3	4	presente separado	-	4.7 mm NL	Pothoff et al. (1986)	≤ 23 cm SL
<i>S. aurata</i>	-	-	-	-	-	-	7.07/5 mm TL	Kiriakos et al. (1994)	≤ 70 cm SL (normal - 30-35 cm SL)
<i>S. aurata</i>	3	24	3	4	presente separado	5 (até 16.0 mm SL)	5.7/6.0 mm SL	Presente trabalho	≤ 70 cm SL (normal - 20-60 cm SL)
<i>T. sparrmanii</i>	-	-	2	2	presente separado	7	4.5 mm NL	Fujita (1994)	≤ 40 cm
<i>T. atlanticus</i>	0	39-41	2	2	presente separado	-	5.3 mm NL	Pothoff et al. (1986)	> 300 cm FL (normal - ≤ 200 cm FL)
<i>T. japonicus</i>	-	-	-	-	-	-	5.78/6.38 mm SL	Balart (1990)	30-60 cm FL
<i>X. gladius</i>	0	26	3	2	presente separado	-	5.1 mm ENL	Pothoff & Kelley (1982)	≤ 4.5 m TL (normal - 2.5-3.5 m TL)

Até ao início dos anos oitenta, pouco se conhecia acerca da cartilagem acessória. No entanto, sobretudo na última década, alguma informação tem sido produzida e está disponível (Potthoff *et al.*, 1984; Balart, 1985; Matsuoka, 1987; Potthoff *et al.*, 1986; Fujita, 1992; Fujita, 1994; Balart, 1995).

Em *P. major* (Matsuoka, 1987), são descritas oito cartilagens acessórias com a seguinte localização:

- * Ac 1 - anterior à ponta da 22^a espinha neural;
- * Ac 2 - anterior à ponta da 12^a espinha hemal;
- * Ac 3 e Ac 4 - entre as pontas das 12^a e 13^a espinhas hemais;
- * Ac 5 - posterior à ponta da 13^a espinha hemal;
- * Ac 6 - posterior à ponta do hipural 5;
- * Ac 7 e Ac 8 - em ambos os lados da ponta da notocorda.

Nas nossas observações e em exemplares de *S. aurata* até aos 16.0 mm SL, foi possível distinguir cinco cartilagens acessórias:

- 1^a - entre a 12^a e 13^a espinhas hemais (correspondente à Ac 3 em *P. major*);
- 2^a - entre a 13^a espinha hemal e o parahipural (correspondente à Ac 5 em *P. major*);
- 3^a - posterior à extremidade superior do hipural 5 (correspondente à Ac 6 em *P. major*);
- 4^a - posterior à parte inferior da 13^a espinha hemal (correspondente à Ac 4 em *P. major*);
- 5^a - anterior à 12^a espinha hemal (correspondente à Ac 2 em *P. major*).

Segundo Johnson (1983, *in* Matsuoka, 1987), o número e distribuição das cartilagens acessórias é, sem dúvida, característico das espécies de determinado taxon, podendo ter provavelmente uma larga utilização sistemática.

Relativamente aos primeiro pterigióforo proximal dorsal e ventral, mais largos que os restantes e ao contrário do sugerido por Kohno *et al.* (1983) em *P. major* e Potthoff *et al.* (1984) em *A. virginicus*, não notámos qualquer evidência que a sua formação se fizesse a partir da fusão de duas estruturas cartilagíneas. Pelo contrário, tal como o observado em *P. major* (Matsuoka, 1985, 1987), constatámos que, a partir do esboço inicial do pterigióforo, se desenvolve um prolongamento anterior, o que leva subseqüentemente ao alargamento (fig. 39).

Matsuoka (1985, 1987) em *P. major* e Houde & Potthoff (1976) em *A. rhomboidalis* referem a ossificação dos pterigióforos médios apenas e respectivamente aos 45.4 mm TL e 42.5 mm SL. Este acontecimento, aliado ao facto de os pterigióforos médios se encontrarem em contiguidade com os pterigióforos proximais, pode explicar e justificar a sua não visualização no nosso estudo.

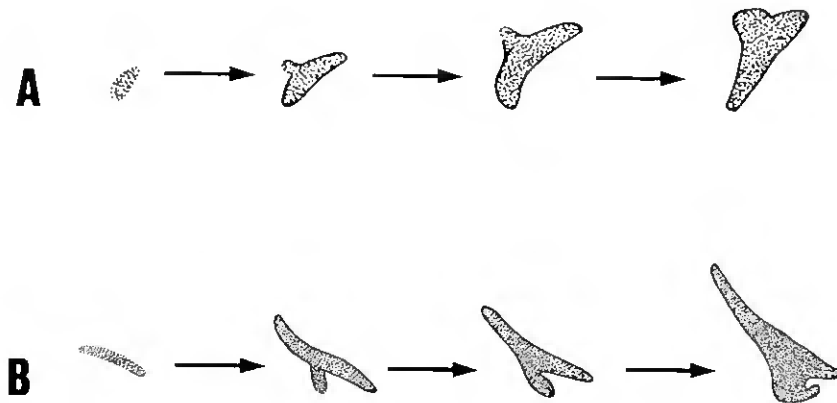


Fig. 39. Formação e desenvolvimento do primeiro pterigióforo proximal (adaptado de Matsuoka, 1987). A - dorsal. B - ventral.

Em *A. virginicus* (Potthoff *et al.*, 1984), *X. gladius* (Potthoff *et al.*, 1986), *S. heterolepis* (Potthoff *et al.*, 1986) e *T. atlanticus* (Potthoff *et al.*, 1986), é sugerido que os pterigióforos proximais e distais, tanto dorsais como ventrais, são formados por segregação de pterigióforos cartilagíneos em forma de haste. Nas nossas observações em *S. aurata*, os pterigióforos proximais e distais cartilagíneos aparecem como estruturas cartilagíneas independentes, desde o início. Semelhante constatação é efectuada por Balart (1985) em *P. olivaceus* e Matsuoka (1985, 1987) em *P. major*.

No que respeita às barbatanas peitorais e ventrais, a ontogenia das diferentes estruturas é semelhante ao verificado em *P. major* (Matsuoka, 1985, 1987), com uma única diferença. Ao contrário do descrito para *P. major* (Matsuoka, 1985, 1987) e *E. japonicus* (Balart, 1995), não tivemos, em *S. aurata*, qualquer evidência da presença do *propterygium* (b. peitorais) e do *metapterygium* (b. ventrais). Nas nossas observações constatámos que, nas barbatanas peitorais, o distal radial que suporta o raio mais superior, se encontra completamente separado da placa da barbatana, tal como referido por Potthoff & Kelley (1982) em *X. gladius* e Potthoff *et al.* (1984) em *A. virginicus*. No entanto, ao contrário destes autores, não tivemos nenhuma evidência de que a sua origem se fizesse a partir da escápula cartilagínea.

Como referido no capítulo II, a ossificação pode apresentar padrões diferentes, consoante se faz a partir de tecido conjuntivo (ossificação acondral) ou de um molde cartilagíneo (ossificação endocondral).

A tabela 4, sumariza o processo de ossificação das diferentes estruturas de *S. aurata* observado no nosso estudo, verificando-se coincidência com o referido para *A. rhomboidalis* (Houde & Potthoff, 1976), *A. virginicus* (Potthoff *et al.*, 1984), *P. olivaceus* (Balart, 1985), *P. major* (Matsuoka, 1985, 1987) e *E.*

japonicus (Balart, 1995). Da mesma forma e em relação ao esqueleto caudal, verifica-se que os tipos de ossificação de *C. batrachus* (Fujita, 1992 a), *O. latipes* (Fujita, 1992 b), *T. sparrmanii* (Fujita, 1994), *C. saira* (Fujita & Oozeki, 1994) e *M. anguillicaudatus* (Ichiyanagi & Fujita, 1995) são iguais ao observado, por nós, em *S. aurata*.

Estes resultados sugerem, relativamente aos tipos de ossificação, um padrão comum aos teleósteos.

Diferentes interpretações, acerca da origem do osso, têm sido feitas em trabalhos que utilizam o método de dupla coloração de Dingerkus & Uhler (1977), para cartilagem e osso. Lau & Shafland (1982), em *Centropomus undecimalis*, sugerem como ossificação endocondral a formação dos uroneurais, raios e *cleitrum* e Kohno *et al.* (1983), em *P. major*, a formação dos *centra*.

Segundo Matsuoka (1985, 1987), observações erróneas acontecem, provavelmente, devido ao facto do Alcian blue corar não apenas cartilagem, mas também tecido fibroso ou tecido ósseo descalcificado, embora a cartilagem core mais intensamente do que outros tecidos. De qualquer forma, a distinção entre cartilagem e outros tecidos deve ser feita com cuidadosa confirmação, utilizando o microscópio.

Atendendo à grande diversidade de tecidos esqueléticos, encontrados em peixes, dever-se-à ter em conta que observações histológicas são da maior importância para a sua caracterização.

Da mesma forma, um campo que continua em aberto e fonte de discussão é o de saber se o osso, em teleósteos, é celular ou acelular.

VII. CONCLUSÕES

- ✓ A osteogênese em *S. aurata* está relacionado com a idade mas sobretudo com o comprimento observado. Em exemplares com a mesma idade, aquele que tem maior comprimento apresenta um mais rápido e maior desenvolvimento das estruturas ossificadas.
- ✓ Em exemplares com o mesmo comprimento, aquele que tem mais idade apresenta um maior desenvolvimento das estruturas ossificadas.
- ✓ O tipo de ossificação é diferente consoante as estruturas, distinguindo-se dois tipos: ossificação a partir de um molde formado por tecido conjuntivo (ossificação acondral) e ossificação a partir de cartilagem já formada (ossificação endocondral).
- ✓ A coluna vertebral é constituída por 24 *centra*, incluindo o uróstilo.
- ✓ O esqueleto caudal (barbatana caudal e estruturas anexas) é composto por três *centra*, incluindo o uróstilo, um arco neural e respectiva espinha, dois arcos hemais e respectivas espinhas, um parahipural, cinco hipurais, dois pares de uroneurais, três epurais, um arco neural especializado, dezassete (9+8) raios moles segmentados principais e cartilagens acessórias (cinco em exemplares até 16.0 mm SL).
- ✓ Em cada barbatana peitoral e respectiva cintura é possível observar o *cleitrum*, o coracóide, a escápula, quatro "actinosts", o *supracleitrum*, o pós-temporal, o *pós-cleitrum*, o supra-temporal, quinze distais radiais e quinze raios moles.
- ✓ A barbatana dorsal é formada por onze espinhas e treze raios moles e as estruturas de suporte apresentam vinte e dois pterigióforos proximais e igual número de pterigióforos distais.
- ✓ A barbatana anal é composta por três espinhas e doze raios moles e nas estruturas de suporte é possível observar catorze pterigióforos proximais e igual número de pterigióforos distais.

- ✓ Cada conjunto barbatana ventral e respectiva cintura é constituído pelo *basipterigium*, uma espinha e cinco raios moles.

- ✓ Estudos comparativos com exemplares selvagens seriam de extrema importância, de modo a inferir das semelhanças/diferenças no que diz respeito à ontogenia das estruturas do esqueleto, das variações merísticas e das anomalias ósseas.

- ✓ As sequências de condrição e ossificação da coluna vertebral em teleósteos apresenta consideráveis diferenças, embora se reconheçam padrões de desenvolvimento semelhante entre espécies afins. Estudos mais exaustivos e pormenorizados podem ser efectuados, de modo a traçar e generalizar, tanto quanto possível, um modelo de desenvolvimento para muitos teleósteos.

BIBLIOGRAFIA

- ABE, H. & GOTOH, S.** (1981). Tissue and species specificity of alkaline phosphatase in marine animals. *Bul. Jap. Soc. Sci. Fish.* **47** (2), 267-273.
- ALBUQUERQUE, R. M.** (1954-1956). Peixes de Portugal e Ilhas Adjacentes - Chaves para a sua determinação. *Portugaliae Acta Biologica* (B) **5**, 1-1164.
- ALONCLE, H.** (1966). Les sparides des côtes Atlantiques du Maroc. *Bull. d'Inst. Pêch. Marit. Maroc.* **14**, 55-66.
- ANDRADES, J. A., BALEBONA, M. C., CARDENAS, S., BECERRA, J. & FERNANDEZ-LLEBREZ, P.** (1990). Malformaciones esqueléticas de la dorada (*Sparus aurata*): estudio de la actividad del Organismo Subcomisural (OSC) y la microflora asociada con los procesos lordóticos. *Actas III Congreso Nac. Acuicult.*, 267-272.
- ARIAS, A.** (1980). Crecimiento, régimen alimentario y reproducción de la dorada (*Sparus aurata* L.) y del robalo (*Dicentrarchus labrax* L.) en los esteros de Cádiz. *Inv. Pesq.* **44** (1), 59-83.
- BALART, E. F.** (1985). Development of median and paired fin skeleton of *Paralichthys olivaceus* (Pleuronectiformes: Paralichthyidae). *Jap. J. Ichthyol.* **31** (4), 398-410.
- BALART, E. F.** (1990). Estudios osteológicos de larvas de *Trachurus japonicus* (Perciformes: Carangidae). I. Formación de los radios de las aletas. *Ciencias Marinas* **16** (4), 141-155.
- BALART, E. F.** (1995). Development of the vertebral column, fins and fin supports in the japanese anchovy, *Engraulis japonicus* (Clupeiformes: Engraulidae). *Bull. Mar. Sci.* **56** (2), 495-522.
- BALON, E. K.** (1986). Saltatory ontogeny and evolution. *Riv. Biol.-Biol. Forum* **79**, 151-190.
- BARAHONA-FERNANDES, M. H.** (1982). Body deformation in hatchery reared European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). Types, prevalence and effect on fish survival. *J. Fish Biol.* **21**, 239-249.
- BARNABÉ, G.** (1989). Chap. 4 - L'élevage du loup et de la daurade. In *Aquaculture*, (Coordination de Gilbert Barnabé), vol. 2, 2ème éd., 675-720 pp.. Technique et Documentation-Lavoisier, Paris.

BERTIN, L. (1958). Tissus squelettiques. In *Traité de Zoologie - Anatomie, Systématique, Biologie* (publié sous la direction de Pierre P. Grassé), tome XIII, fascicule I, 532-550 pp.. Masson et Cie, Éditeurs, Paris.

BERTIN, L. (1958). Vessie gaseuze. In *Traité de Zoologie - Anatomie, Systématique, Biologie* (publié sous la direction de Pierre P. Grassé), tome XIII, fascicule II, 1342-1362 pp.. Masson et Cie, Éditeurs, Paris.

BJORNSSON, B. Th., HAUX, C., BERN, H. A. & DEFTOS, L. J. (1989). 17 - estradiol increases plasma calcitonin levels in salmonid fish. *Endocrinology* **125**, 1754-1760.

BLAXTER, J. H. S. (1988). Chap. 1 - Pattern and Variety in Development. In *Fish Physiology*, (W. S. Hoar & D. J. Randall eds.), vol. XI-A, 1-58 pp.. Academic Press, Inc., U. S. A..

BOND, C. E. (1979). *Biology of Fishes*. 514 pp.. Saunders College Publishing, Philadelphia, U. S. A..

BORRÁS, J. F. & MÍNGUEZ, J. B. (1993). Fisiología de la Nutrición - Alimentación y Energética de la Nutrición en Peces: generalidades. In *Acuicultura Marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*, (Coordinación de F. Castelló Orvay), 177-194 pp.. Publicacions Universitat de Barcelona, Barcelona.

BUJARD, E. (1931). Cartilage et os: quelques réflexions sur les relations génétiques des divers modes de l'ossification néoplasique. *Bull. Histol.* **8**, 265-270.

BURTIS, W. J., WU, T., BUNCH, C., WYSOLMERSKI, J. J., INSOGNA, K. I., WEIR, E. C., BROADUS, A. E. & STEWART, A. F. (1987). Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcaemia of malignancy. *J. Biol. Chem.* **262**, 7151-7156.

CAMUS, P. & KOUTSIKOPOULOS, C. (1984). Incubation experimentale et developpement embryonnaire de la daurade royale, *Sparus aurata* (L.), a differentes temperatures. *Aquaculture* **42**, 117-128.

CARRILO, M. & ZANUY, S. (1993). Fisiología de la Reproducción - Fisiología de la Reproducción de los Teleósteos. In *Acuicultura Marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*, (Coordinación de F. Castelló Orvay), 125-142 pp.. Publicacions Universitat de Barcelona, Barcelona.

- CASTELLÓ ORVAY, F.** (1993). Biología de los Teleósteos Más Interesantes en Piscicultura Marina, in *Acuicultura Marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*, (coordinación de F. Castelló Orvay), 61-67 pp.. Publicacions Universitat de Barcelona, Barcelona.
- CATALDI, E., CATAUDELLA, S., MONACO, G., ROSSI, A. & TANCIONI, L.** (1987). A study of the histology and morphology of the digestive tract of the sea-bream, *Sparus aurata*. *J. Fish Biol.* **30**, 135-145.
- CHATAIN, B.** (1986). La vessie natatoire chez *Dicentrarchus labrax* et *Sparus auratus*, I. Aspects morphologiques du développement. *Aquaculture* **53**, 303-311.
- CHATAIN, B. & OUNAIS-GUSCHEMANN, N.** (1990). Improved rate of initial swimbladder inflation in intensively reared *Sparus aurata*. *Aquaculture* **84**, 345-353.
- CHATAIN, B. & OUNAIS-GUSCHEMANN, N.** (1991). The relationships between light and larvae of *Sparus aurata*. In *Larvi'91 - Fish & Crustacean Larviculture Symposium*, (P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers & F. Ollevier eds.). European Aquaculture Society, Special Publication 15. Gent, Belgium.
- CNEXO** (1983). La Daurade. *Fish. Biotech. Aquacul.*, 33 pp.
- CORMACK, D. H.** (1984). *Introduction to Histology*. 463 pp.. J. B. Lippincott Company, U. S. A..
- DANKS, J. A., DEVLIN, A. J., HO, P. M. W., DIEFENBACH-JAGGER, H., POWER, D. M., CANÁRIO, A., MARTIN, T. J. & INGLETON, P. M.** (1993). Parathyroid hormone-related protein is a factor in normal fish pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* **92**, 201-212.
- DAOULAS, C., ECONOMOU, A. N. & BANTAVAS, I.** (1991). Osteological abnormalities in laboratory reared sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fingerlings. *Aquaculture* **97**, 169-180.
- DEVLIN, A. J., DANKS, J. A., FAULKNER, M. K., POWER, D. M., CANÁRIO, A. V. M., MARTIN, T. J. & INGLETON, P. M.** (1996). Immunochemical detection of parathyroid hormone-related protein in the *saccus vasculosus* of a teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, in press.
- DINGERKUS, G. & UHLER, L. D.** (1977). Enzyme clearing of Alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technology* **52** (4), 229-232.

ELBAL, M. T. & AGULLEIRO, B. (1986). A histochemical and ultrastructural study of the gut of *Sparus aurata* (Teleostei). *J. Submicrosc. Cytol.* **18** (2), 335-347.

ESTABLIER, R., GUTIÉRREZ, M., SARASQUETE, M.^a C., BLASCO, J. & BRAVO, E. (1986). Changes in the phosphatase activity in various organs of the toadfish, *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801), during sexual maturation. *Inv. Pesq.* **50** (2), 271-278.

FAUSTINO, M. & POWER, D. M. (1996). Appearance of calcified tissue in L-thyroxine (T4) treated gilthead sea bream larvae. *Ann. d'Endocrinol.* **57** (supl. au n° 4). Abstracts of lectures and communications - 18th Conference of European Comparative Endocrinologist. Rouen, 10-14 Sept., 1996.

FISHER, W., BAUCHOT, M. L. & SCHENEIDER, M. (redacteurs), (1987). Fiches FAO d'identification des espèces pour le besoin de la pêche (Revision 1). Méditerranée et Mer Noire. Zone de pêche 37, vol. II - Vertébrés, 761-1530 pp.. Publications préparée par la FAO, résultat d'un accord entre la FAO et la commission des Communautés Européennes (Project GCP/INT/422/EEC) financée conjointement par ces deux organizations. Rome.

FLIK, G. (1990). Hypocalcin Physiology. In *Progress in Comparative Endocrinology*, (A. Eppele, C. G. Scanes, M. H. Stetson eds.), 578-585 pp.. Proceeding of the 11th International Symposium on Comparative Endocrinology, held in Malaga, Spain, May 14-20, 1989. Wiley-Liss, Inc..

FLIK, G., KLAREN, P. H. M., SCHOENMAKERS, T. J. M., BIJVELDS, VERBOST, P. M. & WENDELAAR BONGA, S. E. (1996). Cellular calcium transport in fish: unique and universal mechanisms. *Physiol. Zool.* **69** (2), 403-417.

FLIK, G., REIJNTJENS, F. M. J., STIKKELBROECK, J. & FENWICK, J. C. (1982). 1,25-Vit. D₃ and calcium transport in the gut of tilapia (*Sarotherodon mossambicus*). *J. Endocrinol.* **94**, 40.

FLIK, G., VERBOST, P. M. & WENDELAAR BONGA, S. E. (1995). Chap. 12 - Calcium Transport Processes in Fishes. In *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation*, (C. M. Wood & T. J. Shuttleworth eds.), 317-342 pp.. Academic Press.

FOUCHEREAU-PERON, M., ARLOT-BONNEMAINS, Y., MAUBRAS, L., MILHAUD, G. & MOUKHTAR, M. S. (1990). Calcitonin variations in male and female trout, *Salmo gairdneri* during the annual cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **78**, 159-163.

- FUJITA, K.** (1992 a). Ontogeny of the caudal skeleton in the clariid catfish *Clarias batrachus*. *Japan. J. Ichthyol.* **38** (4), 430-432.
- FUJITA, K.** (1992 b). Caudal skeleton ontogeny in the adrianichthyid fish, *Oryzias latipes*. *Japan. J. Ichthyol.* **39** (1), 107-109.
- FUJITA, K.** (1994). Development of caudal skeleton in the cichlid fish, *Tilapia sparrmanii*. *J. Tokyo Univ. Fish.* **81** (1), 47-55.
- FUJITA, K. & OOZEKI, Y.** (1994). Development of the caudal skeleton in the saury, *Cololabis saira*. *Japan. J. Ichthyol.* **41** (3), 334-337.
- GALHARDO, M. L. & ANAIA CRISTO, J. C.** (1989). *Mecanismos Homeostáticos*, vol. 2, 2ª ed.. 206 pp.. Editora Replicação, Lisboa.
- GARTNER, J. V.** (1986). Observations on anomalous conditions in some flatfish (Piscis: Pleuronectiformes), with a new record of partial albinism. *Environ. Biol. Fishes* **17**, 141-152.
- GILBERT, C. R.** (1993). Chap. 1 - Evolution and Phylogeny. In *The Physiology of Fishes*, (David H. Evans, ed.), 1-45 pp.. CRC Press, Boca Raton.
- GUERREIRO, P.** (1996). *Ontogenia da expressão dos genes da hormona de crescimento e da prolactina em estados iniciais de desenvolvimento da dourada, Sparus aurata (Linnaeus, 1758)*. Relatório de estágio do curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas. Universidade do Algarve, Faro, 47 pp..
- GWYN, A. M.** (1940). The development of the vertebral column of the pacific herring (*Clupea pallasii*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* **5** (1), 11-22.
- HADLEY, M. E.** (1992) *Endocrinology*, 3rd ed., 608 pp.. Prentice-Hall Int., Inc..
- HANKEN, J. & WASSERSUG, R.** (1981). The visible skeleton - a new double stain technique reveals the nature of the "hard" tissues. *Functional Photography* **16** (4).
- HANSSEN, R. G. J. M., AARDEN, E. M., VAN DER VENNE, W. P. H. G., PANG, P. K. T. & WENDELAAR BONGA, S. E.** (1991). Regulating of secretion of the teleost fish hormone, stanniocalcin: Effects of extracellular calcium. *Gen. Comp. Endocrinol.* **84**, 155-163.
- HAPPE, A. & ZOHAR, Y.** (1988). Self-fertilization in the protandrous hermaphrodite *Sparus auratus*: Development of the technology. In *Reproduction in Fish - Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics*, (Y. Zohar & B. Breton eds.), 177-180 pp.. INRA Press, Paris.

- HOUDE, E. D. & POTTHOFF, T.** (1976). Egg and larval development of the sea bream *Archosargus rhomboidalis* (Linnaeus): Pisces, Sparidae. *Bull. Mar. Sci.* **26** (4), 506-529.
- HUYSEUNE, A. & SIRE, J.-Y.** (1992). Development of cartilage and bone tissues of the anterior part of the mandible in cichid fish: a light and TEM study. *Anat. Rec.* **233**, 357-375.
- ICHIYANAGI, T. & FUJITA, K.** (1995). Development of the caudal skeleton in the cobitid fish, *Misgurnus anguillicaudatus*. *J. Tokyo Univ. Fish.* **82** (1), 99-102.
- INGLETON, P. M. & DANKS, J. A.** (1996). Distribution and functions of parathyroid hormone-related protein in the vertebrate cells. *Int. Rev. Cytol.* **166**, 231-280.
- INGLETON, P. M., GAITENS, P. V., COULTON, L. A. & RUSSELL, R. G. G.** (1983). An ultrastructural study of alkaline phosphatase in a transplantable rat osteogenic sarcoma. *Metab. Bone Dis. & Rel. Res.* **5**, 23-31.
- INGLETON, P. M., HAZON, N., HO, P. M. W., MARTIN, F. J. & DANKS, J. A.** (1995). Immunodetection of parathyroid hormone-related protein in plasma and tissue of an elasmobranch (*Scyliorhinus canicula*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **98**, 211-218.
- JOBLING, M.** (1995). *Environmental Biology of Fishes*, 1st ed., 455 pp., Chapman & Hall Fish and Fisheries Series - 16. Chapman & Hall, London, Great Britain.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. & KELLEY, R. O.** (1995). *Basic Histology*, 8th ed., 488 pp., Appleton & Lange, Prentice-Hall International, Inc., U. S. A..
- KAMLER, E.** (1995). *Early Life History of Fish - An energetics approach*. 267 pp., Chapman & Hall Fish and Fisheries Series - 4. Chapman & Hall, London, Great Britain.
- KANEKO, T. & PANG, P. K. T.** (1987). Immunocytochemical detection of parathyroid hormone like substance in the goldfish brain and pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* **68**, 147-152.
- KIRIAKOS, Z., KOUMOUNDOUROS, G., DIVANACH, P. & KENTOURI, M.** (1994). Prelarval and larval description of notochord development as a criterion for early detection of tail abnormalities in gilthead seabream (*Sparus auratus*). In *Measures for Success*, (P. Kesiemoni, J. Muir, E. Sevilla & P. Wilhot eds.), 185-190 pp..

- KLYMKOWSKY, M. W. & HANKEN, J.** (1991). Chap. 22 - Whole-mount staining of *Xenopus* and other vertebrates. In *Methods in Cell Biology*, vol. 36, 419-441 pp.. Academic Press, Inc., U. S. A..
- KOHNO, H., TAKI, Y., OGASAWARA, Y., SHIROJO, Y., TAKETOMI, M. & INOUE, M.** (1983). Development of swimming and feeding functions in larval *Pagrus major*. *Japan. J. Ichthyol.* **30** (1), 47-60.
- LAFEBER, F. P. J. G., HANSEN, R. G. J. M., CHOY, Y. M., FLIK, G., HERMANN-ERLEE, M. P. M., PANG, P. K. T. & WENDELAAR BONGA, S. E.** (1988). Identification of hypocalcin isolated from trout Stannius corpuscles. *Gen. Comp. Endocrinol.* **69**, 19-30.
- LAU, S. R. & SHAFLAND P. L.** (1982). Larval development of snook, *Centropomus undecimalis* (Pisces: Centropomidae). *Copeia* **1982** (3), 618-627.
- LAGLER, K. F., BARDACH, J. E., MILLER, R. R. & MAY PASSINO, D. R.** (1977). *Ichthyology*, 2nd ed., 506 pp.. John Wiley & Sons, Inc., U. S. A..
- LEACH, R. J., SCHWARTZ, Z., JOHNSON-PAIS, T. L., DEAN, D. D., LUNA, M. & BOYAN, B. D.** (1995). Osteosarcoma hybrids can preferentially target alkaline phosphatase activity to matrix vesicles: evidence for independent membrane biogenesis. *J. Bone & Min. Res.* **10** (11), 1614-1624.
- LOPEZ, E., TISSERAND-JOCHEM, E.-M., EYQUEM, A., MILET, C., HILLYARD, C., LALLIER, F., VIDAL, B. & MacINTYRE, I.** (1984). Immunocytochemical detection in eel corpuscles of Stannius of a mammalian Parathyroid-like hormone, *Gen. Comp. Endocrinol.* **53**, 28-36.
- LUMARE, F. & VILLANI, P.** (1970). Contributo alla conoscenza delle uova e dei primi stadi larvali di *Sparus aurata* (L.). *Pubbl. Staz. Napoli* **38**, 364-369.
- LUMARE, F. & VILLANI, P.** (1971). Preliminary report on induced spawning and artificial fertilization of *Sparus aurata*. *Boll. Pesca Piscic. Idrobiol.* **26**, 109-112.
- MATSUOKA, M.** (1985). Osteological development in the red sea bream, *Pagrus major*. *Japan. J. Ichthyol.* **32** (1), 35-51.
- MATSUOKA, M.** (1987). Development of the skeletal tissues and skeletal muscles in the red sea bream. *Bull. Seikai Reg. Fish. Res. Lab.* **65**, 1-114.
- MATSUZAWA, T. & ANDERSON, H. C.** (1971). Phosphatases of epiphyseal cartilage studied by electron microscopic cytochemical methods. *J. Histochem. Cytochem.* **19**, 801-808.

- MAZZOLA, A.** (1985). Tecniche di allevamento larvale in *Sparus aurata* L.. *Oebalia* XI (2), 713-727.
- MEUNIER, F. J. & HUYSSEUNE, A.** (1992). The concept of bone tissue in Osteichthyes. *Netherl. J. Zool.* **42** (2-3), 445-458.
- MONOD, Th., HUREAU, J. C. & BULLOCK, A. E.** (1994). Ostéologie céphalique de deux poissons perroquets (Scaridae: Teleostei). *Cybium* **18** (2), 135-168.
- MOSELEY, J. M., KUBOTA, M., DIEFENFACH-JAGGER, H., WETTENHALL, R. E. H., KEMP, B. E., SUVA, L. J., RODDA, C. P., EBELING, P. R., ZAJAC, J. D. & MARTIN, T. J.** (1987). Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **84**, 5048-5052.
- NAVARRO, I., PÁRRIZAS, M. & GUTIÉRREZ, J.** (1993). Fisiología de la Nutrición - Regulación Endócrina de la Nutrición, in *Acuicultura Marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*, (coordinación de F. Castelló Orvay), 275-292 pp.. Publicacions Universitat de Barcelona, Barcelona.
- NODA, H.** (1967 a). Studies on various phosphatases of the fishes - III. Changes in the activities of phosphatases during development of rainbow trout, *Salmo irideus*. *J. Fac. Fish.* **7** (1), 57-64.
- NODA, H.** (1967 b). Studies on various phosphatases of the fishes - IV. Effect of growth up on phosphatases activities of rainbow trout, *Salmo irideus*. *J. Fac. Fish.* **7** (1), 65-71.
- NODA, H. & TACHINO, S.** (1965 a). Studies on various phosphatases of the fishes - I. Enzyme measurements. *J. Fac. Fish.* **6** (3), 291-301.
- NODA, H. & TACHINO, S.** (1965 b). Studies on various phosphatases of the fishes - II. Distribution of phosphatases in the fish organs. *J. Fac. Fish.* **6** (3), 303-311.
- NORBERG, B., BJORNSSON, B. Th., BROWN, C. L., WICHARDT, U. P., DEFTOS, L. J. & HAUX, C.** (1989). Changes in plasma vitellogenin, sex steroids, calcitonin and thyroid hormones related to sexual maturation in female brown trout, (*Salmo trutta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **75**, 316-326.
- OUGHTERSON, S. M., MUNOZ-CHAPULI, R., DE ANDRES, V., LAWSON, R., HEATH, S. & DAVIES, D. H.** (1995). The effects of calcitonin on serum calcium levels in immature brown trout, *Salmo trutta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **97**, 42-48.

- PAPERNA, I.** (1978). Swimbladder and skeletal deformations in hatchery bred *Sparus aurata*. *J. Fish Biol.* **12**, 109-114.
- PERSON-LE RUYET, J. & VERILLAUD, P.** (1980). Techniques d'élevage intensif de la daurade dorée (*Sparus aurata* (L.)) de la naissance a l'âge de deux mois. *Aquaculture* **20**, 351-370.
- POLO, A., YÚFERA, M. & PASCUAL, E.** (1991). Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L.. *Aquaculture* **92**, 367-375.
- POTTHOFF, T.** (1983) Clearing and staining techniques. In *Ontogeny and Systematics of Fishes*. Special Publication Number 1 of American Society of Ichthyologists and Herpetologists, 35-37 pp.. Based on an International Symposium dedicated to the memory of Elbert Halvor Ahlstrom. The Symposium was held August 15-18, 1983, La Jolla, California.
- POTTHOFF, T., KELLEY, S.** (1982). Development of the vertebral column, fins and fin supports, branchiostegal rays and squamation in the swordfish, *Xiphias gladius*. *Fish. Bull.* **80** (2), 161-186.
- POTTHOFF, T., KELLEY, S. & JAVECH, J. C.** (1986). Cartilage and bone development in scombroid fishes. *Fish. Bull.* **84** (3), 647-678.
- POTTHOFF, T., KELLEY, S., MOE, M. & YOUNG, F.** (1984). Description of porkfish larvae (*Anisotremus virginicus*, Haemulidae) and their osteological development. *Bull. Mar. Sci.* **34** (1), 21-59.
- QUÉRO, J.-C.** (1984). *Les Poissons de Mer des Pêches Françaises*, (Jacques Grancher, ed.), 394 pp.. Paris.
- QUÉRO, J. C., HUREAU, J. C., KARRER, C., POST, A. & SALDANHA, L.** (1990). *Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic*, vol. I, II, III, 1-1492 pp.. JNICT, Lisboa.
- RODGER, H. D. & MURPHY, T. M.** (1991). Cranial deformities in Atlantic salmon alevins. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **11**, 219-221.
- SALOMON, C. D.** (1974). A fine structural study on the extracellular activity of alkaline phosphatase and its calcification. *Calc. Tissue Res.* **15**, 201-212.
- SANCHES, J. G.** (1989). *Nomenclatura portuguesa de organismos aquáticos (Proposta para normalização estatística)*. Publicações avulsas do I. N. I. P. nº 14, 322 pp.. I. N. I. P., Lisboa.
- SMITH, M. M. & HEEMSTRA, P. C.** (eds.) (1986). *Smiths' sea fishes*, 6th ed.,

- 1047 pp.. Springer-Verlag, South Africa.
- SOARES, F., DINIS, M. T. & POUÇÃO-FERREIRA, P.** (1994). Development of the swim bladder of cultured *Sparus aurata* L.: a histological study. *Aquac. Fish. Manag.* **25**, 849-854.
- STREWLER, G. J., STERN, P. H., JACOBS, J. W., EVELOTT, K., KLEIN, R. J., LEUNG, S. C., ROSENBLATT, M. & NISSENSON, R. A.** (1987). Parathyroid hormone-like protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J. Clin. Invest.* **80**, 1803-1807.
- SUNDELL, K. & BJORNSSON, B. T.** (1990). Effects of vitamin D₃, 25(OH) vitamin D₃, 24,25(OH)₂ vitamin D₃ and 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ on the *in vitro* intestinal calcium absorption in the marine teleost, Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **78**, 74-79.
- SUVA, L. A., WINSLOW, G. A., WETTENHALL, R. E. H., HAMMONDS, R. G., MOSELEY, J. M., DIEFENFACH-JAGGER, H., RODDA, C. P., KEMP, B. E., RODRIGUEZ, H., CHEN, E. Y., HUDSON, P. J., MARTIN, T. J. & WOOD, W. I.** (1987). A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcaemia: cloning and expression. *Science* **237**, 893-896.
- VAANANEN, H. K.** (1980). Immunochemical localization of alkaline phosphatase in the chicken epiphyseal growth cartilage. *Histochemistry* **65**, 143-148.
- VANDEWALLE, P., FOCANT, B., HURIAUX, F. & CHARDON, M.** (1992). Early development of the cephalic skeleton of *Barbus barbus* (Teleostei, Cyprinidae). *J. Fish Biol.* **41**, 43-62.
- VENGESA, P. B. & HOPFER, U.** (1979). Cytochemical localization of alkaline phosphatase and Na⁺ pump sites in adult rat colon. *J. Histochem. Cytochem.* **27**, 1231-1235.
- VERBOST, P. M., BUTKUS, A., ATSMAN, W., WILLEMS, P., FLIK, G. & WENDELAAR BONGA, S. E.** (1993). Studies on stanniocalcin: characterization of bioactive and antigenic domains of the hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* **93**, 11-16.
- VILLANI, P.** (1976). Allevamento larvale di orata (*Sparus aurata* L.) riprodotta in condizioni artificiali di laboratorio. *Archo Oceanogr. Limnol.* **18** (3), 295-302.
- WAGNER, G. F.** (1996). The evolution of stanniocalcin structure and function. *Ann. d'Endocrinol.* **57** (supl. au n° 4). Abstracts of lectures and communications - 18th Conference of European Comparative Endocrinologist. Rouen, 10-14 Sept.,

1996.

WAGNER, G. F., FLAXMAN, M. T. & HAMILTON, J. T. (1996). A corpuscle of Stannius extract and stanniocalcin both relax the rat thoracic aorta *in vitro*. *Ann. d'Endocrinol.* **57** (supl. au n° 4). Abstracts of lectures and communications - 18th Conference of European Comparative Endocrinologist. Rouen, 10-14 Sept., 1996.

WAGNER, G. & FRIESEN, H. G. (1989). Studies on the structure and physiology of salmon teleocalcin. *Fish Physiol. Biochem.* **7**, 367-374.

WALKER, Jr., W. F. & LIEM, K. F. (1994). *Functional Anatomy of the Vertebrates - An Evolutionary Perspective*, 2nd ed., 788 pp.. Saunders College Publishing, U. S. A..

WENDELAAR BONGA, S. E. (1993). Chap. 15 - Endocrinology. In *The Physiology of Fishes*, (David H. Evans, ed.), 469-502 pp.. CRC Press, Boca Raton.

WENDELAAR BONGA, S. E. & PANG, P. K. T. (1992). Control of calcium regulating hormones in the vertebrates: Parathyroid hormone, calcitonin, prolactin and stanniocalcin. *Int. Rev. Cytol.* **128**, 139-213.

WHITEHEAD, P. J., BAUCHOT, M.-L., HUREAU, J.-C., NIELSEN, J. & TORTONESE, E. (1986). *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*, vol. II, 513-1007 pp.. Unesco, U.K..

WITHERS, P. C. (1992). *Comparative Animal Physiology*. 949 pp.. Saunders College Publishing, U. S. A..

ZAKI, M. I. (1984). Artificial Culture and Early Ontogeny of Gilthead, *Sparus aurata*, of the Mediterranean Sea. *J. Ichthyol.*, 56-63.

ZOHAR, Y., ABRAHAM, M. & GORDIN, H. (1978). The gonadal cycle of the captivity reared hermaphroditic teleost *Sparus aurata* (L.) during the first two years of life. *Annales Biologie Animale Biochimie Biophysique* **18**, 877-882.

ZOHAR, Y., BILLARD, R. & WEIL, C. (1984). La reproduction de la daurade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*): connaissance du cycle sexuel et contrôle de la gamétogenèse et de la ponte. In *Aquaculture du Bar et des Sparidés*, (G. Barnabé & R. Billard, eds.), 3-24 pp.. INRA Publ., Paris.

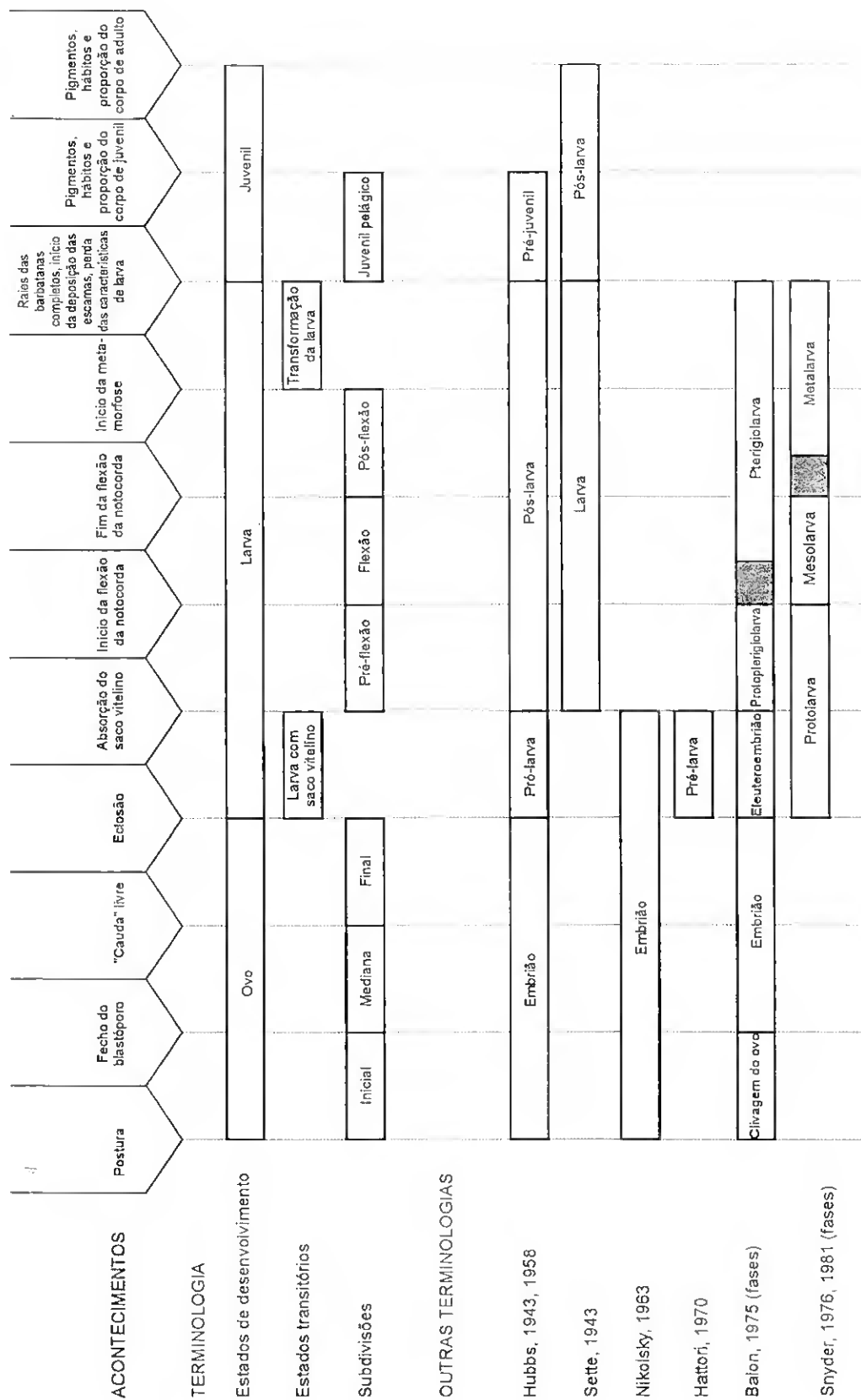
ZOHAR, Y., HAREL, M., HASSIN, S. & TANDLER, A. (1995). Chap. 5 - Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata*). In *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*, (Niall R. Bromage & Ronald J. Roberts, eds.), 94-117 pp..

Blackwell Science Ltd, Cambridge, Great Britain.

ANEXOS

Anexo 1

Terminologia utilizada nos estados iniciais do desenvolvimento dos peixes (retirado de Kendall *et al.*, 1984, *in* Blaxter, 1988).



Anexo 2

SOLUÇÕES

PFA a 1%

Para 250 ml:

A 225 ml de água estéril, adicionar 2.5 g de PFA (Sigma, P-6148) e 25 µl de hidróxido de sódio (2 M). Aquecer, em banho maria, a 65° C até dissolver completamente. Deixar arrefecer à temperatura ambiente e adicionar 25 ml de fosfato de potássio. Acertar pH (7.4). Guardar, no máximo 2 semanas, no frigorífico. Usar frio.

TBST

Para 300 ml:

Dissolver 1.8 g de Tris (Sigma, T-1503), 2.62 g de cloreto de sódio e 280 µl Triton X-100 (Riedel-de Haen, 56029) em 250 ml de água bidestilada. Acertar o pH (7.4). Perfazer com água bidestilada até completar 300 ml. Guardar, no máximo 2-3 semanas, no frigorífico.

Alcian Blue 8GX

Para 100 ml:

A 20 mg de Alcian Blue 8GX (Sigma, A-3157), adicionar 70 ml de etanol a 100% e 30 ml de ácido acético glacial. Dissolver bem e guardar, no máximo 6 meses, no frigorífico. Usar à temperatura ambiente.

Solução stock de Alizarin Red S a 1% (solução alcalina)

A 1 g de Alizarin Red S (Sigma, A-5533), adicionar 100 ml de hidróxido de potássio a 1%. Acertar o pH (12.58). Guardar e utilizar à temperatura ambiente.

Solução de incubação

A 8 ml de β -glicerofosfato de sódio (Sigma, G-6376) a 3%, juntar 22 ml de cloreto de cálcio (Sigma, C-7902) a 2%, 10 gotas de sulfato de magnésio (Sigma, M-2643) a 1% e 0.6 g de barbital sódico (Merck, art. 6318). Adicionar água destilada até perfazer 50 ml. Acertar o pH (9.4). Guardar no frigorífico.

Anexo 3

Classificação dos teleosteos objecto da discussão (segundo Smith & Heemstra, 1986).

