



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

**Ciclo Hormonal Reprodutor, Clonagem e Expressão
da Enzima P450 Aromatase na Tilápia, *Oreochromis
mossambicus* (Teleostei: Cichlidae)**

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

O PRESIDENTE DO JÚRI:

O Reitor da Universidade do Algarve

VOGAIS:

Doutor Adelino Vicente Mendonça Canário,

Professor Catedrático da Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente da Universidade do Algarve;

Doutor Jeffrey Charles Wallace,

Professor Catedrático da Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente da Universidade do Algarve;

Doutora Deborah Mary Power,

Professora Catedrática da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve;

Doutor Rui Filipe Nunes Pais de Oliveira,

Professor Associado com agregação do Instituto Superior de Psicologia Aplicada;

Doutora Sílvia Cristina da Cruz Marques Socorro,

Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

Mário António Pestana de Almeida e Cruz

Faro, 2006



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

**Ciclo Hormonal Reprodutor, Clonagem e Expressão
da Enzima P450 Aromatase na Tilápia, *Oreochromis
mossambicus* (Teleostei: Cichlidae)**

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

O PRESIDENTE DO JÚRI:

O Reitor da Universidade do Algarve

VOGAIS:

Doutor Adelino Vicente Mendonça Canário,

Professor Catedrático da Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente da Universidade do Algarve;

Doutor Jeffrey Charles Wallace,

Professor Catedrático da Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente da Universidade do Algarve;

Doutora Deborah Mary Power,

Professora Catedrática da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve;

Doutor Rui Filipe Nunes Pais de Oliveira,

Professor Associado com agregação do Instituto Superior de Psicologia Aplicada;

Doutora Sílvia Cristina da Cruz Marques Socorro,

Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

O conteúdo desta dissertação é da exclusiva responsabilidade do autor.

Mário António Pestana de Almeida e Cruz

Faro, 2006

NOME: Mário António Pestana de Almeida e Cruz
FACULDADE: Ciências do Mar e do Ambiente
ORIENTADOR: Professor Adelino Canário, Universidade do Algarve
DATA: Novembro 2006
TÍTULO DA TESE: Ciclo Hormonal Reprodutor, Clonagem e Expressão da Enzima P450 Aromatase na Tilápia, *Oreochromis mossambicus* (Teleostei: Cichlidae)

RESUMO

A aromatase é a enzima responsável pela conversão de androgénios em estrogénios. Nos peixes teleósteos, ao contrário de na maioria dos restantes vertebrados, são produzidas duas isoformas de aromatase codificadas por genes diferentes, sendo uma maioritariamente localizada nas gónadas (codificada pelo gene *Cyp19A*) e a outra no cérebro (gene *Cyp19B*). Este trabalho teve como um dos principais objectivos a clonagem e análise da expressão dos transcritos das duas isoformas de aromatase em tilápia moçambicana, *Oreochromis mossambicus*, tendo-se iniciado pela análise detalhada do ciclo sexual desta espécie em cativeiro. Determinou-se a duração do ciclo sexual e a variação de hormonas esteróides ao longo do mesmo. O Intervalo entre duas posturas consecutivas apresentou uma classe modal centrada nos 17 dias e a distribuição do estradiol-17 β e da 17,20 β -P seguiram os padrões descritos para espécies próximas, com o estradiol-17 β a exibir um pico na fase de vitelogénese activa e a 17,20 β -P com uma subida junto à fase final do ciclo. Estudou-se a expressão de ambas as formas da aromatase ao longo do ciclo sexual feminino e do desenvolvimento embrionário, assim como no cérebro de ambos os sexos. As duas formas da aromatase parecem expressar-se muito cedo no desenvolvimento embrionário (1dpf), bem como numa vasta gama de tecidos. Por hibridação *in situ* localizaram-se os transcritos para os dois genes da aromatase em núcleos cerebrais importantes na mediação de comportamentos sexuais e de cuidados parentais em ambos os sexos, embora nem sempre com distribuição coincidente. Esta evidência sugere que a produção de estrogénios no sistema nervoso central parece mediar de alguma forma a regulação do comportamento reprodutor na tilápia.

Palavras-chave

Aromatase; gene *Cyp19A*; gene *Cyp19B*; Hibridação *in situ*; *Oreochromis mossambicus*, Tilápia; Comportamento reprodutor.

THESIS TITLE: Reproductive hormonal cycle, cloning and expression of P450 Aromatase enzyme in Tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Teleostei: Cichlidae)

ABSTRACT

Aromatase is the key enzyme responsible for the conversion of androgens to estrogens. In teleosts, unlike in the majority of vertebrates, two aromatase isoforms are present encoded by different genes, of which one is mainly produced in the gonads (encoded by the *Cyp19A* gene), and the other in the brain (encoded by the *Cyp19B* gene). One of the main objectives of this study was the cloning and expression analysis of transcripts from both aromatase isoforms in the Mozambican tilapia, *Oreochromis mossambicus*. A detailed analysis of the sexual cycle of this species in captivity determined the duration and the variation of some hormones during the cycle. The interval between two consecutive spawning events showed a modal class centered on 17 days, and the distributions of estradiol-17 β and 17,20 β -P followed the patterns described for related species. Whereas estradiol shows a peak during the active vitelogenesis phase, 17,20 β -P was elevated close to the final phase of the cycle. The expression of both forms of aromatase was studied during the female sexual cycle, during embryonic development, and in the brain of males and females. Both isoforms are expressed very early during development (1dpf), and in a wide variety of tissues. As determined by *in situ* hybridization, the transcripts of both aromatase genes are located in cerebral nuclei important for the mediation of sexual behaviors and parental care in both sexes, though not always with similar distributions. This evidence seems to indicate that the production of estrogens in the central nervous system mediates the regulation of the reproductive behavior in tilapia.

Key-words

Aromatase; *Cyp19A* gene; *Cyp19B* gene; *in situ* hybridization; *Oreochromis mossambicus*, Tilapia; Reproductive behavior.

LISTA DE COMUNICAÇÕES, PUBLICAÇÕES E SEQUÊNCIAS SUBMETIDAS

CONFERÊNCIAS INTERNACIONAIS

- *Conference on Comparative Biochemistry and Physiology*, “Expression Of P450arom And Estrogen Receptors Alfa And Beta During Early Development Of Tilapia *Oreochromis Mossambicus*”. **Cruz, M.**, Canário, A. V. M. (Lion, 2000).
- *20th Conference of Comparative Endocrinologists*, “Pattern of expression of two aromatases and α and β estrogen receptors during early development of tilapia *Oreochromis mossambicus*”. **Cruz, M.**, Canario, A.V.M. (Faro, 2000).
- *20th Conference of Comparative Endocrinologists*, “Olfactory responses to conspecifics in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*”. Hubbard, P.C., Barata, E.N., **Cruz, M.**, Canario, A.V.M. (poster) (Faro, 2000).
- *6th International Symposium On Reproductive Physiology of Fish*, “cDNA cloning and expression of brain and ovary aromatase in tilapia, *Oreochromis mossambicus*”, **M. Cruz** e A.V.M. Canario. (poster) (Bergen, 1999).
- *Scottish Conference on Animal Behaviour*, “Comparative study of aggressive behaviour in three fish species in relation to substrate”, Miguel Repas, Carla Costa; Sónia Perez, Frederico Almada, David Gonçalves, **M. Cruz**, Ricardo Matos e Edgar Pereira. (Edinburgh, 1994).

CONFERÊNCIAS NACIONAIS

- *VI Seminário de aquacultura*, “Clonagem de P450 Aromatase em tilápia *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae)”, **M. Cruz**, A.V.M. Canário. (Viana do Castelo, 1998).
- *1^o Simpósio sobre a Margem Continental Ibérica Atlântica*, “Comparação do comportamento agonístico de *Lepadogaster lepadogaster purpurea* (Bonnaterre, 1788), *Gairdopsarus mediterraneus* (Linnaeus, 1758) e *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758)”, David Gonçalves

Carla Costa, Sónia Perez, Frederico Almada, **M. Cruz**, Ricardo Matos, Edgar Pereira e Miguel Repas. (Lisboa, 1994).

- *III Congresso Nacional de Etologia*, “Breves considerações sobre hierarquias de dominância em *Diplodus vulgaris* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1817) (Pisces: Sparidae)”, **M. Cruz**, F. Almada e V. Almada. (Coimbra, 1998).

ARTIGOS CIENTÍFICOS EM REVISTAS INTERNACIONAIS COM ARBITRAGEM

- **Cruz, M** and Canario, AVM. Differential tissue and developmental expression of CYP19 genes in the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. Submetido a *Comparative Physiology and Biochemistry-Part B- Biochemistry and Molecular Biology*.

ARTIGOS CIENTÍFICOS EM REVISTAS NACIONAIS COM ARBITRAGEM

- Almada, F.; **Cruz, M.**; Gomes, C.; Gonçalves, D.; Rodrigues, J. P. 1995. Contribuição para a determinação do estatuto taxonómico de *Pulicaria microcephala* Lange (Asteraceae). Boletim da Sociedade Broteriana Sér. 2, 67: 43-5

SEQUÊNCIAS SUBMETIDAS A NCBI BLAST

- *Tilapia mossambica* ovary cytochrome P450 aromatase mRNA, complete cds., **M. Cruz** e A.V.M. Canario. Referência de acesso: AF135851.
- *Tilapia mossambica* brain cytochrome P450 aromatase mRNA, partial cds. **M. Cruz** e A.V.M. Canario. Referência de acesso: AF135850.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Adelino Canário, meu orientador e amigo, e a quem sempre tratei por “Mestre”, não por desrespeito, mas por ser aquele que ensina, que partilha e que gosta de transmitir o saber. Obrigado por tudo: pela confiança desde o início do trabalho, pela amizade e pela presença, pelo convívio, por toda a orientação e pelo entusiasmo com que me foi contagiando sempre que foi preciso. Mas sobretudo obrigado pela força e por ter acreditado em mim na recta final. Sem ele não teria, literalmente, conseguido.

À Professora Deborah Power, um agradecimento muito especial: pelos conselhos que fui ouvindo na altura certa e sempre que passava por mim na bancada. Sempre pertinentes e dirigidos ao que era importante. Consigo aprendi a pensar sobre, e a perceber grande parte dos problemas que a biologia molecular me foi trazendo. Mais ainda, obrigado pelo apoio e orientação no capítulo dos *in situ* e na imunocitoquímica. Não falo apenas da orientação prática, mas sobretudo no apoio e confiança que me transmitiu na recta final que foram fundamentais para concluir com sucesso todo o meu trabalho. Obrigado por ter acreditado em mim e por me ter ajudado a fazer o mesmo.

Aos dois, obrigado por tudo...

Ao meu amigo e colega Xoan Fuentes pela presença constante, pelo dia-a-dia, pelos conselhos permanentes no laboratório e sobretudo nas questões práticas sempre que foi preciso “meter a mão no peixe”. Obrigado por me teres ensinado que nada do que existe no laboratório é um monstro e que com calma até uma pipeta consegue ser dominada. Obrigado por me ensinares tudo da fisiologia que para mim hoje é claro e que faz parte da minha formação.

À Elsa, que me ajudou com a elaboração de alguns RIAs e com quem aprendi todos os detalhes sobre a parte prática de tudo o que se relaciona com a extracção, quantificação e análise de esteróides.

À Cecília, à Katerina e à Sílvia, sem nenhuma ordem específica, com quem aprendi grande parte do que hoje sei sobre biologia molecular. Os vossos conselhos e apoios permanentes foram, também, fundamentais para a minha formação.

À Dulce Estevão, companheira na longa aprendizagem que foram os in situ e amiga, um muito obrigado por tudo. E como se não bastasse, também na revisão final do texto.

Ao Marco Campinho, por toda a ajuda e companheirismo desde que lhe ensinei como mudar as fraldas a uma tilápia, até ao fim do meu trabalho em que ele esteve sempre presente e em que tanto me ensinou... Obrigado ainda, Marco, pela ajuda nos dotblots.

À Dr^a Rita Teodósio pela ajuda na elaboração dos PCRs individuais às larvas e adultos.

A todo o pessoal do laboratório (pelo menos o do meu tempo...): João Condeça, João Cardoso, Carlos Vale, Paulo Vília, Manuel Faustino, Teresa Modesto, Ana engenheira, Natália, Rute Martins, Pedro Guerreiro, Silvia Nobre, Liliana Anjos, Eduardo Cavaco, Eduardo Barata, Peter Hubbard, Pepe, Lilia Brinca. Deixo as minhas desculpas aos que poderão ter ficado esquecidos... Foram todos importantes sobretudo no que se refera ao “tornar o dia-a-dia mais leve enquanto se trabalha”.

Ao Prof. Dr. Rui Oliveira por toda a ajuda ao longo dos anos, mas sobretudo na parte final deste trabalho, na ajuda na recolha bibliográfica e por me ter sempre incentivado a prosseguir.

Ao Dr. João Reis pela ajuda na preparação das experiências no PRODEP e no Ramalhete e por me ter ensinado a tratar e a reproduzir as tilápias.

Ao João Socorro, um obrigado também, pela ajuda na manutenção das tilápias no início do meu trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Lechner pela ajuda na recolha de bibliografia sobre o Citocromo P450 e por todo o seu entusiasmo em torno do meu trabalho, embora não me conhecesse pessoalmente.

À Célia e à Sofia Rodrigues por toda a ajuda na recolha da bibliografia dos “artigos da treta”...

A todos os meus amigos que foram estando presentes: Élio, Dani, Nuno Henriques e tantos outros...

Ao Fred, um obrigado particularmente especial. Estamos juntos desde sempre e espero que por muito mais...

Agradeço ainda ao João Pedro Rodrigues pela incansável ajuda na formatação do documento e ajuda na recta final. Tu sabes bem a importância que tiveste... e ao Repas pela disponibilização da sua laser para a impressão final. Aos dois, obrigado por todo o apoio.

Aos meus irmãos e à minha tia porque em grande parte a eles devo o que sou hoje como pessoa. Um beijinho muito grande a todos.

À minha Avó agradeço por tudo o que sempre fez por mim e por ainda hoje ser um dos meus pilares. Um beijinho grande Biá.

Obrigado Chinha, pelo espaço que me cedeu para trabalhar e por tudo o mais. Há coisas que são impagáveis e impossíveis de descrever.

A ti Rita um beijinho muito especial por tudo o que me ajudaste e por teres estado lá ao longo destes anos que não foram fáceis. Por todo o percurso e por toda a presença; pelo carinho e por nunca me teres deixado desistir. Obrigado por tudo...

Ao João e à Lila, que entraram na minha vida com uma força incalculável e da qual espero que nunca mais saiam... Traga-nos a vida o que trouxer. A vocês devo grande parte da minha estabilidade emocional, do carinho, afecto e apoio que fui tendo desde que iniciei este processo. São mais importantes do que alguma vez poderão imaginar...

Para terminar... Ao meu Vento Fresco da Serra, que desce todos os dias o Cântaro Magro, e que me foi fazendo sorrir e mantendo a caminhar...

Agradeço à Fundação para a Ciência e para a Tecnologia pela bolsa do programa Praxis XXI que permitiu este trabalho.

Ao Nuno Bragança, que esteve presente nas noites mais duras da minha vida, e ao Francisco, que assumiu essa função num passado recente.

ÍNDICE GERAL

Resumo	v
Abstract	vii
Lista de Comunicações, Publicações e Sequências Submetidas	ix
Agradecimentos	xi
Índice Geral	xvii
Índice de Figuras	xxiii
Índice de Tabelas	xxix
Acrónimos	xxxii

Capítulo I – Introdução Geral	1
1.1 Visão geral.....	3
1.2 Endocrinologia da reprodução dos peixes teleósteos.....	4
1.2.1 Ciclo endócrino feminino	6
1.3 Ciclídeos: biologia e comportamento.....	12
1.4 Tilápia Moçambicana: biologia, comportamento e endocrinologia reprodutiva	13
1.4.1 Reprodução e comportamento sexual	14
1.4.2 Ciclo endócrino reprodutivo	18
1.4.3 Endocrinologia do comportamento.....	19
1.5 A Super – Família do Citocromo P450	22
1.5.1 Citocromo P450-aromatase.....	23

1.5.2	Influência da aromatase na determinação e na diferenciação sexual em vertebrados	42
1.6	Receptores de estrogénios	44
1.7	Organização geral da tese.....	49

Capítulo II – Ciclo Ovulatório e Hormonal na Tilápia Moçambicana 51

2.1	Introdução.....	53
2.2	Materiais e métodos	55
2.2.1	Manutenção dos animais em cativeiro.....	55
2.2.2	Recolha de amostras para extracção dos esteróides.....	55
2.2.3	Extracção de esteróides do plasma	57
2.2.4	Radioimunoensaios	60
2.2.5	Tratamento dos dados	60
2.3	Resultados	60
2.3.1	Duração do ciclo sexual feminino da tilápia.....	60
2.3.2	Variação hormonal durante o ciclo sexual da tilápia	63
2.4	Discussão.....	69

Capítulo III - Clonagem e Expressão Ontogénica do Citocromo P450-Aromatase e dos Receptores de Estrogénios..... 75

3.1	Introdução.....	77
3.2	Material e métodos	78

3.2.1	Manutenção dos animais em cativeiro	78
3.2.2	Recolha de tecidos	79
3.2.3	Extracção e purificação de RNA.....	80
3.2.4	Electroforese em gel de agarose	81
3.2.5	Produção das sondas de cDNA.....	81
3.2.6	Clonagem dos produtos de PCR	82
3.2.7	Construção dos bancos de cDNA de cérebro e de ovário de tilápia	84
3.2.8	Pesquisa dos bancos de cDNA.....	89
3.2.9	Análise e Caracterização das sequências de Aromatase	93
3.2.10	RT-PCR semi quantitativo	93
3.2.11	Análise por <i>Northern Blot</i>	94
3.2.12	Análise por <i>Southern blot</i> dos produtos de RT-PCR.....	95
3.2.13	Expressão de <i>CYP19A</i> , <i>CYP19B</i> e receptores de estrogénio α e β durante o desenvolvimento inicial.....	96
3.3	Resultados	97
3.3.1	Bancos de cDNA.....	97
3.3.2	Clonagem e caracterização dos homólogos da aromatase	97
3.3.3	Análise filogenética.....	99
3.3.4	Expressão do mRNA de P450 aromatase nos tecidos da tilápia.....	102
3.3.5	Expressão de <i>CYP19A</i> , <i>CYP19B</i> e receptores de estrogénio α e β durante o desenvolvimento inicial.....	105
3.3.6	Expressão de <i>CYP19A</i> , <i>CYP19B</i> e receptores de estrogénio α e β durante o ciclo reproductivo.....	107
3.4	Discussão.....	109

Capítulo IV - Distribuição dos Transcritos da Aromatase no Cérebro da Tilápia	113
4.1 Introdução.....	115
4.2 Materiais e métodos	117
4.2.1 Recolha, fixação e armazenamento de amostras.....	118
4.2.2 Processamento histológico.....	119
4.2.3 Coloração com hematoxilina e eosina	120
4.2.4 Hibridação <i>in situ</i>	121
4.2.5 Especificidade das sondas	122
4.2.6 Imunohistoquímica	133
4.3 Resultados	134
4.3.1 Morfologia geral do cérebro de tilápia.....	134
4.3.2 Expressão da aromatase no cérebro do macho	140
4.3.3 Expressão da aromatase no cérebro da fêmea.....	153
4.3.4 Expressão da aromatase na pituitária de <i>O. mossambicus</i>	169
4.3.5 Controlo Negativo.....	174
4.4 Discussão.....	175
<hr/>	
Capítulo V - Discussão geral	185
Capítulo VI – Bibliografia	195

Anexos	249
Anexo I – Soluções	251
Anexo II – Meios de cultura e preparação de células	263
Anexo III – Procedimentos Experimentais Complementares	267

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema geral do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas.....	5
Figura 2 – Esquema representativo da conversão de testosterona em 17 β -estradiol.....	23
Figura 3 – Estrutura do gene da aromatase no homem.....	26
Figura 4 – Estrutura da proteína dos receptores de estrogénios nos humanos.....	46
Figura 5 – Estrutura do gene dos receptores de estrogénios.....	47
Figura 6 – Esquema representativo da experiência montada para determinação da variação das taxas de natação ao longo do dia em fêmeas de <i>Oreochromis mossambicus</i>	56
Figura 7 – Variação do intervalo entre posturas para diferentes fêmeas.....	62
Figura 8 – Ritmos de actividade das fêmeas ao longo do dia.....	63
Figura 9 – Concentração das diferentes fracções para o estradiol-17 β ao longo do ciclo sexual feminino. Os dados foram obtidos a partir de fêmeas com intervalos entre posturas compreendidos entre 14 e 34 dias.	64
Figura 10 – Concentração de estradiol-17 β total no ciclo sexual feminino da tilápia. Os dados foram obtidos a partir de fêmeas com intervalos entre posturas compreendidos entre 14 e 34 dias.	65
Figura 11 – Concentração das diferentes fracções para o estradiol-17 β em fêmeas com intervalos entre posturas superiores a 34 dias.	65
Figura 12 – Concentração plasmática de estradiol-17 β total em fêmeas com intervalos entre posturas superiores a 34 dias.	66
Figura 13 – Concentração de 17,20 β -P e seus conjugados ao longo do ciclo sexual feminino da tilápia em fêmeas com ciclos regulares compreendidos entre 14 e 34 dias.	66
Figura 14 – Concentração de 17,20 β -P total em fêmeas de <i>O. mossambicus</i> , durante o seu ciclo sexual.....	67

Figura 15 – Concentração plasmática das fracções livres e conjugadas de 17,20 β -P ao longo do ciclo sexual das fêmeas com intervalos entre posturas superiores a 34 dias.	68
Figura 16 – Concentração plasmática de 17,20 β -P total ao longo do ciclo sexual das fêmeas com intervalos entre posturas superiores a 34 dias.....	68
Figura 17 – Esquema dos tanques de incubação com o respectivo sistema de manutenção dos ovos e larvas.	79
Figura 18 – Marcador de peso molecular 1Kb-plus utilizado para avaliação dos tamanhos dos insertos.	81
Figura 19 – Esquema do vector pGEM – T Easy utilizado nas clonagens de produtos de PCR com indicação dos locais de restrição.	83
Figura 20 – Vector pBluescript II SK (+/-) utilizado na construção dos bancos de cDNA indicando os sítios de restrição para clonagem.	88
Figura 21 – Esquema da pilha de transferência do DNA do gel de agarose para as membranas de nylon para <i>Northern</i> e <i>Southern blot</i>	95
Figura 22A – Sequência do clone 3OV1, com a indicação da localização do início da sequência e do codão stop.....	98
Figura 22B – Sequência do clone F3BR3 com a indicação da localização do início da sequência e do codão stop.....	99
Figura 23 – Análise filogenética utilizando máxima parsimónia a partir de um alinhamento de sequências da proteína aromatase de diferentes vertebrados	101
Figura 24 – Análise por <i>Northern blot</i> efectuada a mRNA de ovário (Ov) e cérebro (Br) de <i>O. mossambicus</i> : a) Hibridação com uma sonda composta pelo clone da aromatase do ovário; b) Hibridação com um fragmento de restrição extraído do clone da aromatase do cérebro.....	102
Figura 25 – Análise por <i>Northern blot</i> efectuada a RNA total de cérebro (Br),	

ovário (Ov), rim (Kd), fígado (Lv), testículo (Tt), rim anterior (Hk), coração (Ht), vesícula biliar (Bd), brânquias (Gl), pituitária (Pt) e músculo (Ms).....	103
Figura 26 – RT-PCR realizado utilizando os <i>primers</i> específicos para a aromatase do cérebro e do ovário, usando cDNA de cérebro (Br), ovário (Ov), rim (Kd), fígado (Lv), testículo (Tt), rim anterior (Hk), coração (Ht), vesícula biliar (Bd), brânquias (Gl), pituitária (Pt) e músculo (Ms) como tecidos alvo.	104
Figura 27 – Análise por RT-PCR de ambos os genes da aromatase, receptores de estrogénios α e receptor de estrogénios β , durante o primeiro mês de vida de <i>O. mossambicus</i> . A) Gel de eletroforese com o resultado da extração de mRNA de 3 larvas; B) Gráfico resultante da análise de larvas individuais com os valores ponderados pelos obtidos para a β -actina.	106
Figura 28 – Análise por RT-PCR de <i>Cyp19A</i> e <i>Cyp19B</i> no ovário e cérebro, respectivamente durante o ciclo do ovário.	107
Figura 29 – Análise por RT-PCR de ER α e ER β_1 no ovário e cérebro durante o ciclo do ovário.	108
Figura 30 – Vector pBluescript II SK (+/-) utilizado na construção dos bancos de cDNA.	126
Figura 31 – Esquema de um corte mediano de um cérebro de uma fêmea adulta de tilápia (2310 μ m desde a periferia). No esquema estão representadas as principais divisões.	134
Figura 32 – Representação esquemática da região mediana sagital do cérebro de uma fêmea. O corte apresentado situa-se a 2288 μ m da periferia do tecido	136
Figura 33 – Resultado da coloração com hematoxilina e eosina a um corte mediano do cérebro de uma fêmea.	138
Figura 34 – Esquema de três cortes sagitais do cérebro de um macho de <i>Oreochromis mossambicus</i> . As três imagens A, B e C correspondem	

respectivamente a cortes situados a 400, 1280 e 1600 μ m medidos da periferia para o interior do cérebro.	142
Figura 35 – Esquema do corte sagital do cérebro do macho a 1180 μ m da periferia. ...	144
Figura 36 – Hibridação <i>in situ</i> com a sonda F3BR3.	145
Figura 37 – Esquema de um corte sagital mediano do cérebro de um macho adulto correspondente a 1640 μ m a partir da periferia do tecido.	146
Figura 38 – Hibridação <i>in situ</i> com a sonda F3BR3 ao corte sagital mediano de um cérebro de macho (1760 μ m).	147
Figura 39 – Em cima esquema de um corte sagital do cérebro de um macho adulto correspondente ao corte 440 μ m; em baixo um corte da mesma estrutura, mas correspondente ao corte com 1408 μ m.	150
Figura 40 – Hibridação <i>in situ</i> com a sonda 3OV1.	151
Figura 41 – Corte sagital esquemático da região mediana do cérebro de um macho (1760 μ m desde a periferia do tecido).	152
Figura 42 – Hibridação <i>in situ</i> com a sonda 3OV1.	153
Figura 43 – Esquema de três cortes sagitais do cérebro de uma fêmea de <i>Oreochromis mossambicus</i> . As três imagens A, B e C correspondem respectivamente aos cortes 1056 μ m, 2112 μ m e 2310 μ m efectuados ao cérebro. .	156
Figura 44 – Esquema de um corte sagital do cérebro de uma fêmea. O corte foi feito a 1056 μ m da periferia do tecido.	158
Figura 45 – Hibridação <i>in situ</i> com a sonda F3BR3.	158
Figura 46 – Esquema de um corte sagital correspondente a 2112 μ m de espessura desde a periferia do tecido, em que são destacadas as regiões que apresentam sinal específico para o gene <i>Cyp19B</i>	159

Figura 47 – Hibridação <i>in situ</i> com a sonda F3BR3 na secção sagital intermédia do cérebro de fêmea.....	161
Figura 48 – Esquema de um corte sagital mediano do cérebro de uma fêmea de <i>O. mossambicus</i> . Esta secção do tecido corresponde a uma espessura de 2310 µm.	162
Figura 49 – Hibridação <i>in situ</i> com a sonda F3BR3 no cérebro da fêmea na terceira secção amostrada.	163
Figura 50 – Esquema de um corte sagital do cérebro da fêmea, a aproximadamente 946µm da periferia do tecido.	164
Figura 51 – Hibridação <i>in situ</i> com a sonda 3OV1 na primeira secção do cérebro da fêmea amostrada.	165
Figura 52 – Esquema do corte intermédio do cérebro da fêmea utilizado para a detecção dos transcritos do gene <i>Cyp19A</i>	166
Figura 53 – Hibridação <i>in situ</i> com a sonda 3OV1 na segunda secção do cérebro da fêmea amostrada.	166
Figura 54 – Corte esquemático da secção sagital do cérebro da fêmea, sensivelmente coincidente com a região mediana do cérebro.....	167
Figura 55 – Hibridação <i>in situ</i> com a sonda 3OV1 na segunda secção do cérebro da fêmea amostrada.	168
Figura 56 – Imunohistoquímica da glândula pituitária utilizando anticorpos para: A – somatolactina, B – Prolactina, C – Hormona do crescimento (GH).	170
Figura 57 – Esquema comparativo da distribuição dos sinais específicos entre os dois genes da aromatase na pituitária do macho.....	171
Figura 58 – Hibridação <i>in situ</i> com as sondas F3BR3 e 3OV1 na pituitária no macho de <i>O. mossambicus</i>	172

Figura 59 – Comparação dos sinais específicos entre os dois genes na pituitária da fêmea.....	172
Figura 60 – Hibridação <i>in situ</i> com as sondas F3BR3 e 3OV1 na pituitária na fêmea de <i>O. mossambicus</i>	173
Figura 61 – Controlos negativos. As fotos A e C expressam dois controlos negativos diferentes; em A, o controlo foi feito não utilizando sonda; em B, o controlo foi feito utilizando RNases.	174
Figura 62 – Esquema representativo da secção mediana do cérebro do macho com a representação da distribuição dos transcritos identificados para cada gene.	176
Figura 63 – Esquema representativo da secção mediana do cérebro da fêmea com a representação da distribuição dos transcritos identificados para cada gene.	180

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Esteróides mais abundantes no plasma sanguíneo (Principais C21) e esteróides indutores de maturação final dos ovócitos (MIS) nalgumas espécies de teleósteos pertencentes a diferentes famílias.....	10
Tabela 2 – Total de amostras de sangue retiradas a cada fêmea de tilápia.....	57
Tabela 3 – Processo de extracção das diferentes fracções de esteróides e conjugados a partir de amostras de plasma de tilápia	59
Tabela 4 – Distribuição por tanque e por fêmea da regularidade das posturas.....	61
Tabela 5 – Referência, sequência e dimensão dos <i>primers</i> utilizados para a obtenção das sondas e para a análise por PCR semi-quantitativo.....	93
Tabela 6 – Processo de fixação dos tecidos e conseqüente tratamento das amostras. ..	119
Tabela 7 – Protocolo detalhado dos dotblots realizados para confirmação da especificidade das sondas.	123
Tabela 8 – Protocolo de linearização das sondas.....	123
Tabela 9 – Preparação do DNA e transcrição <i>in vitro</i> com oligonucleótidos não marcados.....	125
Tabela 10 – Processo de transcrição <i>in vitro</i> com oligonucleótidos marcados com Digoxigenina e Biotina.....	127
Tabela 11 – Principais passos do protocolo para a <i>hibridação in situ</i>	131

ACRÓNIMOS

11K-T – 11 cetotestosterona

17,20 β ,21-P – 17,20 β ,21-trihidróxi-4-pregnen-3-ona

17,20 α -P – 17,20 α -dihidróxi-4-pregnen-3-ona

17,20 β -P – 17,20 β -dihidróxi-4-pregnen-3-ona

17,21-P – 11-desoxicortisol

3 α ,17,21-P-5 α – 17 α ,21-dihidroxi-5 β -pregnane-3,20-diona

A – Androstenediona

AVT – Arginina-vasotossina

BnST – Núcleo intersticial da estria terminal

BO – Bolbo olfativo

C – Cerebelo

cAMP – Monofosfato de adenosina cíclica

cDNA – DNA complementar

cm – Centímetro

Cps – Contagens por segundo

Cven – Comissura ventral telencefálica

DEPC – Dietilpirocarbonato

DHT – 5 α -dihidrottestosterona

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E₂ – Estradiol-17 β

E₃ – Estrona

ER α – Receptor de estrogénios α

ERE – Elementos de resposta a estrogénios

ER β – Receptor de estrogénios β

FSH – Foliculina

GH – Hormona do crescimento

GnRH – Hormona libertadora de gonadotrofinas

GTH – Hormonas gonadotróficas

h – Horas

HCG – Gonadotrofina de córion humano (*Human corionic gonadotrophin*)

Hyp – Hipotálamo

IEP – Intervalo entre posturas

IGF-I – Factor de crescimento semelhante à insulina

IGS – Índice gonadossomático

L – Litros

LH – Luteína

M – Molar

m³ – Metros cúbicos

mg – Miligramas

min – Minutos

MIS – Esteróide indutor da maturação final dos ovócitos

ml – Mililitros

MLF – Fascículo longitudinal mediano

mM - Milimolar

MO – Medula oblongata

mRNA – RNA mensageiro

ng – nanogramas

NO – Nervo óptico

NVII_m – Núcleo facial motor

P – Progesterona

P450_{arom} – Citocromo P450 aromatase

P450_{aromA} – Citocromo P450 aromatase ovário

P450_{aromB} – Citocromo P450 aromatase cérebro

pb – Pares de bases

PCR – Reacção de polimerização em cadeia

Pfu – Unidades formadoras de placas de lise

Pit – Pituitária ou hipófise

pmol – picomoles

POA – Área pré-óptica do hipotálamo

PRL – Prolactina

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – Reacção de polimerase em cadeia de transcrição reversa

SL – Somatolactina

SMN – Núcleo sónico motor

T – Testosterona

TO – Tecto óptico

U – Unidades

V – Volt

VIIs – Base sensorial do nervo facial

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 VISÃO GERAL

Nos vertebrados a regulação dos processos de reprodução encontra-se dependente da acção de hormonas sexuais (esteróides) que têm a sua principal origem nas gónadas em ambos os sexos. Estas hormonas controlam não só os processos fisiológicos ligados à produção e manutenção dos gametas, mas também muitos dos comportamentos sexuais e agonísticos que determinam a escolha do parceiro sexual e a passagem dos genes de uma geração para a outra. Embora os padrões comportamentais típicos associados a cada género sexual resultem ultimamente das sequências de genes inscritos nos cromossomas, por vezes é necessário um ambiente hormonal adequado numa fase inicial do desenvolvimento para que esse padrão seja activado. É o que se passa nalguns vertebrados superiores (aves e mamíferos) em que o desempenho comportamental sexual masculino está dependente da acção de mecanismos neuroendócrinos estabelecidos durante as fases iniciais do ciclo de vida. Neste processo, a presença de estrogénios convertidos localmente em áreas específicas do sistema nervoso central, é determinante para a activação destes comportamentos nos adultos através de uma combinação de mecanismos de acção genómicos e não genómicos (Balthazart *et al.*, 2004; Balthazart *et al.*, 2003). O passo metabólico essencial pelo qual os androgénios aromatizáveis são convertidos em estrogénios é desempenhado pela enzima aromatase, sendo esta enzima, um regulador cerebral do comportamento sexual nos vertebrados superiores.

No caso dos peixes, o processo neuroendócrino da mediação do comportamento não está ainda completamente clarificado. No entanto, este grupo de vertebrados apresenta níveis de expressão da aromatase no cérebro bastante mais elevados do que os restantes vertebrados, o que poderá indicar que também nestes vertebrados o processo de aromatização poderá ter um significado importante no comportamento.

Embora os estrogénios sejam na generalidade libertados para o plasma sanguíneo onde são transportados para actuar em células alvo, muitas das funções que lhes são atribuídas podem ser explicadas através da sua produção local. Assim, torna-se possível que um vasto universo de funções possa ser regulado de forma mais específica, existindo diferentes

mecanismos reguladores para diferentes locais de expressão.

Os processos que regulam a expressão da aromatase nos mamíferos superiores são bastante complexos e envolvem, de forma geral, apenas uma cópia do gene *Cyp19*, que codifica para a enzima aromatase. Nos peixes teleósteos, existem duas cópias do gene que codificam proteínas funcionais, o que potencialmente aumenta a complexidade da regulação da produção local da aromatase, adicionalmente aos efeitos endócrinos e de produção de transcritos alternativos por promotores específicos.

A riqueza de comportamentos sexuais e agonísticos nos peixes teleósteos, aliada à escassez de estudos sobre o processo de regulação neuroendócrina do comportamento nestes animais, em especial sobre o papel da aromatase, motivaram esta tese. O objectivo da tese foi iniciar estudos de base sobre a enzima aromatase, com especial ênfase na clonagem e análise da sua distribuição em tecidos.

Como modelo foi utilizado um ciclídeo africano, a tilápia moçambicana, *Oreochromis mossambicus*. A espécie apresenta comportamentos sexuais e agonísticos conspícuos e pode emitir várias posturas ao longo do ano se se encontrarem em situações climáticas favoráveis. Em conjunto, estes factores tornam esta espécie num excelente modelo biológico, capaz de ajudar na compreensão de mecanismos que regulam e medeiam os comportamentos sexuais, e toda a actividade reprodutora no geral.

1.2 ENDOCRINOLOGIA DA REPRODUÇÃO DOS PEIXES TELEÓSTEOS

O principal eixo endócrino que controla a reprodução nos peixes é, tal como noutros vertebrados, o eixo hipotálamo-pituitária-gónada (Figura 1). A pituitária (ou hipófise) produz dois tipos de gonadotrofinas denominadas foliculina (FSH) e luteína (LH), por analogia aos vertebrados superiores. Estas hormonas são distribuídas pela corrente sanguínea, fundamentalmente, para estimular directamente as gónadas a produzirem esteróides. A síntese e libertação de gonadotrofinas está dependente de sinais estimuladores e inibidores provenientes das gónadas (Levavi-Sivan *et al.*, 2006), do hipotálamo e, em primeira instância, de estímulos exteriores

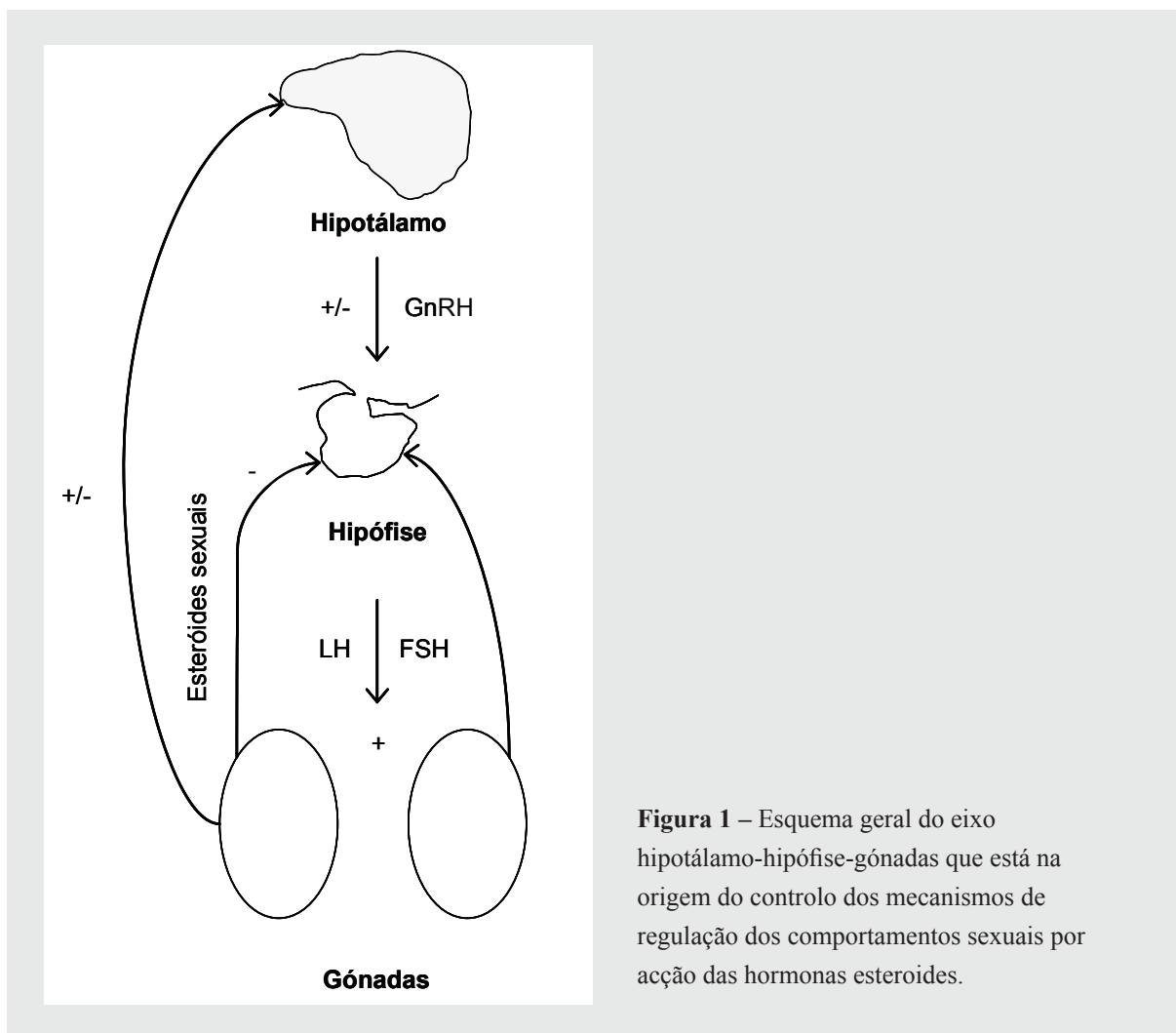


Figura 1 – Esquema geral do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas que está na origem do controlo dos mecanismos de regulação dos comportamentos sexuais por acção das hormonas esteroides.

(temperatura, fotoperíodo e ambiente social) (Francis *et al.*, 1993).

No hipotálamo, um conjunto específico de neurónios sintetizam a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), um decapeptido que, na ausência de um sistema capilar portal nos peixes é libertado por inervação directa das células gonadotróficas (e.g. Stefano *et al.*, 1999). Até hoje foram detectadas 3 formas de GnRH na maior parte dos teleósteos estudados. Uma destas formas, denominada galinha-II, é comum a todos eles pela sua localização e potência na libertação de gonadotrofinas tanto *in vitro* como *in vivo* (Degani *et al.*, 1997; Schulz *et al.*, 1994; Zohar *et al.*, 1995). A função da FSH não é bem conhecida, embora lhe sejam atribuídas funções nas primeiras fases de desenvolvimento das gónadas, nomeadamente na vitelogénese nas fêmeas e na espermatogénese nos machos (Schulz *et al.*, 2001; Tyler *et al.*, 1997). A função da LH está relacionada com os estádios finais de maturação das gónadas,

ovulação e espermição (Planas *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2001).

Os esteróides produzidos pelas gónadas masculinas e femininas, nomeadamente testosterona (T) e estradiol-17 β (E₂), exercem funções de retroacção positiva e negativa sobre as gonadotrofinas na pituitária dependendo do estágio de desenvolvimento. Por exemplo, a T tem retroacção positiva sobre as gonadotrofinas, possivelmente sobre a LH, em juvenis (Crim & Evans, 1983; Huang *et al.*, 1997; Magri *et al.*, 1985), enquanto que o E₂ exerce retroacção negativa sobre a LH durante a vitelogénese (Larsen & Swanson, 1997; Saligaut *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 1983). É da remoção desta inibição que resulta o chamado surgimento de LH que leva ao aumento de esteróides maturantes no plasma sanguíneo e à maturação dos ovócitos em peixes (Scott & Canario, 1987; Nagahama *et al.*, 1995). A retroacção positiva da T em machos maduros de esgana-gata (*Gasterosteus aculeatus*) foi também descrita para ambas as gonadotrofinas (Borg *et al.*, 1986). Os trabalhos que pretendem determinar quais as hormonas esteróides envolvidas no ciclo reprodutor têm seguido essencialmente duas abordagens. Uma delas visa compreender a variação dos diferentes esteróides ao longo de um ciclo reprodutor natural ou quando o ambiente (físico, social e endócrino) dos indivíduos é manipulado, utilizando para isso o doseamento de hormonas presentes no sangue. A outra abordagem utiliza ensaios *in vitro* de modo a isolar os possíveis mediadores dos processos fisiológicos, através do doseamento hormonal em fluidos ou tecidos. Ambas as abordagens apresentam algumas limitações e muitos estudos utilizam-nas de forma conjunta (Lokman & Young, 1995).

1.2.1 CICLO ENDÓCRINO FEMININO

A reprodução é um fenómeno complexo não só nos vertebrados superiores, mas também na classe dos peixes. Dentro desta classe, a diversidade de processos reprodutivos entre as diferentes espécies é notável. Ambos os sexos apresentam em cada caso particular uma sincronia quer a nível do enquadramento fisiológico, quer dos processos comportamentais.

A reprodução é regulada de forma cíclica por mecanismos endócrinos e a secreção de hormonas responsáveis por estes processos está inclusivamente relacionada com factores

externos, como a temperatura (Clark *et al.*, 2005; Shimizu, 2003; Shimizu *et al.*, 1994), o fotoperíodo (exemplos em Biswas *et al.*, 2005; Frantzen *et al.*, 2004; Lamba *et al.*, 1983; Migaud *et al.*, 2004) e o enquadramento social (exemplo em Black *et al.*, 2005), que consequentemente afectam a reprodução, obedecendo assim a um padrão repetitivo que pode apresentar diferentes periodicidades. Este padrão pode ser circanual nas espécies que se reproduzem apenas uma vez por ano e de menor período nas outras, podendo haver até ciclos diários, ainda que restritos a uma determinada fase do ano (Fukada *et al.*, 1994; Matsuyama *et al.*, 2002). Não obstante a variação derivada do ciclo reprodutor, a concentração de diferentes hormonas esteróides em circulação no plasma pode também variar ao longo do dia, como acontece com o salmonídeo *Salvelinus leucomaenis*, em indivíduos de ambos os sexos que estejam em ovulação ou espermição activas (Yamada *et al.*, 2002). Este facto sugere que estas hormonas podem estar implicadas no controlo de outras funções cíclicas, em períodos muito mais restritos do que os referentes ao ciclo reprodutor como por exemplo, na mediação dos processos comportamentais ou nas diferentes actividades diárias dos indivíduos.

Em algumas espécies de vertebrados, o carácter cíclico da reprodução é determinado essencialmente pelo sexo feminino, uma vez que os machos apresentam uma disponibilidade permanente ou quase permanente para a emissão de gâmetas. Em *O. mossambicus* por exemplo, desde que as condições abióticas, nomeadamente no que se refere à temperatura da água, sejam óptimas e permitam simular uma situação natural tropical, as fêmeas ovulam ciclicamente em períodos curtos variáveis entre 30 a 40 dias (Vass & Hofstede, 1952 in Trewavas, 1983; Smith & Haley, 1987) e os machos apresentam disponibilidade para acasalar assim que exista uma fêmea sexualmente disponível.

O ciclo sexual feminino nos peixes é, à semelhança dos mamíferos, regulado por diferentes tipos de hormonas, entre as quais as gonadotrofinas e as hormonas esteróides. Destas últimas serão destacadas duas: o E_2 , responsável pela fase inicial do ciclo promovendo a vitelogénese, e a $17,20\beta$ -dihidróxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\beta$ -P), responsável pelo processo de maturação final dos ovócitos (Kime, 1993).

O E_2 sofre uma subida rápida de concentração no plasma dos teleósteos na fase de

vitelogenese (e.g. Singh & Singh, 1987), ligando-se aos receptores de estrogénios hepáticos e estimulando a produção de vitelogenina. Na truta marinha (*Cynoscion nebulosus*) existe uma correlação positiva entre os níveis de E_2 e de vitelogenina com os receptores de estrogénios hepáticos na fase inicial do ciclo, desaparecendo esta correlação nas fases seguintes, como resultado da emissão de posturas múltiplas (Smith & Thomas, 1991). Também na dourada (*Sparus aurata*), existe uma relação entre os níveis de E_2 e a expressão dos receptores de estrogénios e a vitelogenina, sendo estes mais elevados no período de pré-postura e diminuindo após a emissão dos gâmetas (Mosconi *et al.*, 2002).

A duração dos ciclos sexuais é muito variável em teleósteos. No entanto, existe uma grande similaridade geral nos processos fisiológicos, incluindo a vitelogenese, na qual o E_2 tem um papel fundamental, e a maturação sexual dos ovócitos. Os salmonídeos têm sido utilizados como um dos principais objectos de estudo para a compreensão das variações hormonais dos ciclos de reprodução, por serem espécies importantes do ponto de vista comercial (Kime, 1993). Na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), por exemplo, foi determinado que a $17,20\beta$ -P (C_{21}) é o principal responsável pela maturação final dos ovócitos (Scott *et al.*, 1983). Nesta espécie, aproximadamente 16 dias antes da ovulação, os valores de gonadotrofinas em circulação no plasma começam a aumentar, atingindo um valor máximo 20 dias após a ovulação (Scott *et al.*, 1983). Esta subida é acompanhada pela descida dos valores de E_2 e de T, embora a última seja ligeiramente mais tardia do que a verificada para o E_2 . Por outro lado, os valores de $17,20\beta$ -P aumentam significativamente 4 dias antes da ovulação, decaindo logo em seguida. O mesmo padrão verifica-se para diferentes linhas de indivíduos da mesma espécie, que apresentem épocas de reprodução com diferentes desfasamentos temporais (Scott & Sumpter, 1983). Se por um lado a produção de gonadotrofinas parece estar neste caso a ser estimulada pela diminuição dos valores do E_2 , esta subida estimula também a rápida subida dos valores da $17,20\beta$ -P, indicando este esteróide como o mediador da maturação final dos ovócitos (Scott *et al.*, 1983). Já anteriormente a $17,20\beta$ -P, juntamente com a 17-hidroxiprogesterona (seu precursor), tinham sido identificados como dois dos mais potentes indutores da ovulação nesta (Campbell *et al.*, 1980), e noutras espécies de salmonídeos (Nagahama & Adachi,

1985). Por outro lado, resultados de bioensaios realizados *in vitro* em *O. mykiss* utilizando 17,20 β -P como esteróide de referência, revelaram que outros 4 progestogénios 20 β -hidroxilados apresentavam também uma potência equivalente na indução da maturação final dos ovócitos (Canario & Scott, 1988). Entre estes esteróides a 17,20 β ,21-trihidróxi-4-pregnen-3-ona (17,20 β ,21-P) foi identificada como esteróide indutor da maturação final na rabeta brasileira (*Micropogonias undulatus*) (Trant *et al.*, 1986). Ainda na truta arco-íris, Canário e colaboradores (1989) detectaram também um destes esteróides em fêmeas ovuladas, embora em concentrações muito inferiores às de 17,20 β -P.

Noutras espécies de peixes, a variação dos níveis de progestagénios poderá não ter um padrão que os associe necessariamente à sua potencial função. Por exemplo, na solha (*Pleuronectes platessa*), a 17,20 β -P foi indicada como o esteróide indutor da maturação (Scott & Canario, 1987; Canario & Scott, 1990a), mas os seus valores em circulação no plasma não variam muito ao longo do ciclo. Contudo, foram detectadas diferenças significativas na concentração de 17,20 β -P e dos seus conjugados entre os estádios IV e V/VI do desenvolvimento dos ovários das fêmeas (Scott *et al.*, 1998). *P. platessa* produz também outros tipos de esteróides C₂₁ nas gónadas das fêmeas, dos quais se destacam o 11-desoxicortisol (17,21-P) e a 17 α ,21-dihidroxi-5 β -pregnane-3,20-diona (3 α ,17,21-P-5 α), surgindo uma grande proporção destes esteróides sob a forma de conjugados com sulfatos e com glucoronidos (Canario & Scott, 1989a; Canario & Scott, 1990b). Noutro pleuronectiforme (solha do Mar do Norte), o esteróide presente em maior quantidade é a 17,20 α -dihidróxi-4-pregnen-3-ona (17,20 α -P), enquanto que 17,20 β -P apresenta valores baixos e essencialmente sob a forma de um conjugado (Canario & Scott, 1989b). No robalo, *Dicentrarchus labrax*, não só não foram detectadas variações sazonais significativas nos níveis de 17,20 β -P, como os valores de E₂ e de T parecem manter-se relativamente elevados (Prat *et al.*, 1990). No entanto, esta espécie produz níveis elevados de 17,20 β ,21-P, o que pode sugerir que, neste caso, seja este o esteróide indutor da maturação (Scott *et al.*, 1990). Também na garoupa vermelha (*Epinephelus morio*), que emite posturas em série, os valores de E₂ mantêm-se elevados durante os meses da reprodução, embora com um pico no início desta (Johnson *et al.*, 1998). Adicionalmente, fêmeas capturadas que

se encontravam no estágio de maturação final dos ovócitos apresentam níveis médios de E_2 bastante elevados, não existindo quaisquer diferenças significativas nos valores de $17,20\beta$ -P em relação às fases de maturação anteriores (Johnson *et al.*, 1998). Este padrão foi também referido noutras espécies de peixes, como a enguia (*Anguilla dieffenbachii*) (Lokman & Young, 1995). Neste caso, em que não há maturação espontânea, é necessário induzir a maturação dos folículos ovários injectando gonadotrofina coriônica humana (HCG) (Epler & Bieniarz, 1978; Lopez & Fontaine, 1990).

Contrariamente ao descrito para o robalo, em *Morone saxatilis*, uma espécie relativamente próxima, a variação dos perfis de esteróides na fase de maturação final dos ovócitos parece seguir o padrão normal, com os estrogénios e androgénios a serem substituídos por $17,20\beta$ -P; $17,20\beta$, 21-P durante a maturação final (King *et al.*, 1994).

Tabela 1 – Esteróides mais abundantes no plasma sanguíneo (Principais C₂₁) e esteróides indutores de maturação final dos ovócitos (MIS) nalgumas espécies de teleósteos pertencentes a diferentes famílias. As esteróides indicados com (*) significa putativos MIS.

Família	Nome comum	Nome científico	Principais C ₂₁	MIS	Referência
Salmonidae	Truta arco-íris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	$17,20\beta$ -P	$17,20\beta$ -P	(Scott <i>et al.</i> , 1983) Canário, 1988
Salmonidae	Salmão	<i>Oncorhynchus rhodurus</i>	$17,20\beta$ -P	$17,20\beta$ -P	(Nagahama & Adachi, 1985)
Sciaenidae	Rabeta brasileira	<i>Micropogonias undulates</i>	$17,20\beta$ -P; $17,20\beta,21$ -P	$17,20\beta,21$ -P	(Trant <i>et al.</i> , 1986),
Pleuronectidae	Solha	<i>Pleuronectes platessa</i>	11-desoxicortisol; $3\alpha,17,21$ -P- 5β	$17,20\beta$ -P*	(Scott & Canario, 1987)
Pleuronectidae	Solha do mar do norte	<i>Limanda limanda</i>	$17,20\alpha$ -P; $3\beta,17\beta,20\alpha$ - P- 5α	$17,20\beta$ -P*	(Canario & Scott, 1989b)
Moronidae	Striped Bass	<i>Morone saxatilis</i>	$17,20\beta$ -P; $17,20\beta,21$ -P	$17,20\beta,21$ -P*	(King, 1995 ^a in Mylonas <i>et al.</i> , 1998)
Scombridae	Cavala	<i>Scomber Japonicus</i>	$17,20\beta$ -P	$17,20\beta$ -P	(Matsuyama <i>et al.</i> , 2005)
Labridae		<i>Halichoeres poecilopterus</i>	$17,20\beta$ -P; $17,20\beta,21$ -P	$17,20\beta$ -P; $17,20\beta,21$ -P	(Matsuyama <i>et al.</i> , 2002)
Fundulidae	Killifish	<i>Fundulus heteroclitus</i>		$17,20\beta$ -P	(Petrino <i>et al.</i> , 1993)
Adrianichthyidae	Medaka	<i>Oryzias latipes</i>		$17,20\beta$ -P	(Fukada <i>et al.</i> , 1994)
Carangidae		<i>Seriola quinqueradiata</i>		$17,20\beta$ -P	(Rahman <i>et al.</i> , 2002)
Sparidae		<i>Acanthopagrus schlegeli</i>		$17,20\beta,21$ -P	(Yueh <i>et al.</i> , 2005)
Percidae		<i>Gymnocephalus cernuus</i>	$17,20\beta$ -P; $17,20\beta,21$ -P	$17,20\beta,21$ -P	(Sorensen <i>et al.</i> , 2004)

Esta discussão tem sido centrada na reconhecida função na maturação final dos ovócitos e do papel do esteróide de maturação $17,20\beta\text{-P}$ (e $17,20\beta,21\text{-P}$). Em alguns teleósteos, (e.g. *Oncorhynchus mykiss*) o padrão temporal de libertação de alguns esteróides presentes na urina corresponde a variações idênticas das respectivas hormonas no plasma (Scott & Liley, 1994), estando mesmo documentado para *O. mossambicus* que os metabolitos desta hormona detectados na urina apresentam valores mais elevados em relação aos detectados no plasma (Rocha & Reis-Henriques, 1996). Também a partir da urina é possível obter informação a este respeito, com a vantagem adicional de esta ser muito mais fácil de recolher do que o plasma sanguíneo. Inclusivamente, a concentração de diferentes esteróides na urina parece, pelo menos em alguns casos, aumentar significativamente em relação aos mesmos esteróides presentes no plasma, podendo por vezes atingir valores muito superiores aos encontrados no sangue (Canario & Scott, 1989a). Por exemplo, os níveis de conjugados de $17,20\beta\text{-P}$ no plasma da solha são bastante baixos (inferiores a $2,7\text{ng/ml}$) (Scott & Canario, 1990), enquanto que na urina estes conjugados atingem valores consideráveis, especialmente para os conjugados com sulfatos (aproximadamente 1500ng/ml) (Scott & Canario, 1992), e semelhantes aos detectados para os conjugados de outros esteróides como os de 11-desoxicortisol (aproximadamente 1300ng/ml) e de $3\alpha,17,21\text{-P-}5\beta$ (aproximadamente 1700ng/ml) (Canario & Scott, 1989a).

Foi também demonstrado que a $17,20\beta\text{-P}$ e a $17,20\beta\text{-P-sulfato}$ têm fortes propriedades odorantes no peixe vermelho (*Carassius auratus*) (Sorensen *et al.*, 1991) e em salmão (*Salmo salar*) (Moore & Scott, 1992). Por outro lado, a urina foi identificada como um dos canais de excreção de $17,20\beta\text{-P-sulfato}$ na truta arco-íris (Vermeirssen & Scott, 1996). É possível que estas hormonas e os seus metabolitos tenham funções feromonais noutras espécies embora existam muitas espécies que não conseguem cheirar pelo menos os esteróides mais comuns (Murphy *et al.*, 2001).

1.3 CICLÍDEOS: BIOLOGIA E COMPORTAMENTO

As tilápias são um vasto grupo de espécies de peixes teleósteos pertencentes à família Cichlidae. Embora apresentem uma distribuição mundial, tiveram origem nos grandes lagos em África, onde, por competição, foram forçadas a encontrar diferentes estratégias de sobrevivência, no que se refere a hábitos de alimentação, à ocupação de diferentes *habitats* e às estratégias de reprodução (Trewavas, 1983). Nalguns lagos Africanos sobrepovoados, ocorre ainda um processo de especiação intensa, o que conjuntamente com a exibição de comportamento sociais complexos, elevadas taxas reprodutoras e valor alimentar, tornou este grupo de peixes um dos mais intensamente estudados.

A designação tilápia aplica-se essencialmente aos géneros *Tilapia*, *Serotherodon* e *Oreochromis* que apresentam comportamentos reprodutores distintos. *Tilapia* é formado exclusivamente por incubadores de substrato; *Serotherodon* é composto por incubadores bocais, sendo o macho ou ambos os sexos, a incubar a descendência (com apenas algumas exceções em que são exclusivamente fêmeas a desempenhar este papel); *Oreochromis* é também constituído por incubadores bucais, sendo exclusivamente a fêmea a realizar os cuidados parentais (Trewavas, 1982; Trewavas, 1983), tendo os incubadores bocais evoluído a partir dos incubadores de substrato (Nagl *et al.*, 2001).

Estes diferentes tipos de cuidados parentais não são, contudo, exclusivos destes três géneros de ciclídeos (Kuwamura, 1986; Kuwamura *et al.*, 1989). Nos grandes lagos Africanos, estas diferentes estratégias são de tal modo importantes que determinam em boa parte (juntamente com hábitos os alimentares) a distribuição vertical das várias espécies deste grupo. De uma forma geral, os incubadores bucais encontram-se em águas menos profundas (entre 0 e 5m), com substratos essencialmente arenosos, e os incubadores de substrato ocupam uma maior diversidade de substratos, distribuindo-se também por uma maior amplitude de profundidades (Kuwamura, 1987).

Estas estratégias encontram-se amplamente difundidas por toda a família Cichlidae, verificando-se neste grupo um dos conjuntos de sistemas de cuidados parentais mais elaborados entre os peixes. Estratégias de cuidados biparentais, em que ambos os

progenitores se encontram envolvidos em simultâneo, ocorrem em várias espécies desta família. Nestes casos, a presença de ambos os progenitores, podendo um deles desempenhar um papel de maior relevância (Keenleyside, 1985), parece em alguns casos ser indispensável para a protecção dos juvenis que são rapidamente predados se pelo menos um dos progenitores for removido (Nagoshi, 1987). Noutras situações, esta dependência pode diminuir com a idade dos alevins (Keenleyside & Mackereth, 1992), que apenas 7 dias após a eclosão conseguem já sobreviver na ausência de um dos progenitores. A remoção (artificial ou não) de um dos progenitores não afecta apenas o desenvolvimento da descendência mas também o comportamento do progenitor sobrevivente em relação à sua descendência (Yanagisawa, 1985; Lavery & Reeb, 1994). Noutras espécies, embora ambos os progenitores pareçam ter um papel activo nos cuidados parentais antes da eclosão das posturas, as competências dos dois intervenientes alteram-se quando os alevins passam a ser natatoriamente activos. Nesta fase, a fêmea é a principal responsável pela manutenção da descendência, enquanto que o macho se dedica essencialmente à defesa do território (Coeckelberghs, 1975).

1.4 TILÁPIA MOÇAMBICANA: BIOLOGIA, COMPORTAMENTO E ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA

A espécie *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) é originária de Moçambique, tendo um conjunto de características biológicas que a elegeram como uma das principais espécies utilizadas em laboratório. Estas características incluem a tolerância a condições de cativeiro e a grandes amplitudes de temperatura e osmolaridade, elevadas taxas de reprodução e comportamentos reprodutores elaborados. Uma síntese da sua biologia, ecologia e comportamento foi feita por Oliveira (1995), pelo que se sumarizam apenas alguns aspectos mais relevantes para este trabalho, nomeadamente no que se refere ao ciclo reprodutivo e as alterações comportamentais associadas.

1.4.1 REPRODUÇÃO E COMPORTAMENTO SEXUAL

Dependendo das condições do meio onde vivem, as populações desta espécie podem reproduzir-se todo o ano (De Silva & Chandrasoma, 1980) ou concentrar a época de reprodução apenas no período mais quente, como acontece com a população do lago Sibaya na África do Sul (Bruton & Bolt, 1975). O rácio entre os sexos (*sex-ratio*) parece ser variável. Embora com valores próximos de 1:1, têm sido propostas diferentes proporções de machos e de fêmeas por diferentes autores e para diferentes populações (De Silva & Chandrasoma, 1980; De Silva, 1986; Bluhdorn & Arthington, 1990). A idade da primeira maturação sexual parece também variar com o sexo, em cada população, flutuando entre os 2-3 meses e os 2 anos de vida, o que implica uma enorme gama de dimensões (revisão em Trewavas, 1983; De Silva & Chandrasoma, 1980).

Como é característico do género *Oreochromis*, a tilápia moçambicana apresenta dimorfismo sexual acentuado por um dicromatismo marcado, que se torna bastante evidente na altura da reprodução. Os machos reprodutores apresentam uma coloração negra intensa ao longo de todo o corpo, apenas com a região sub mandibular branca, e os bordos das barbatanas caudal anal e dorsal com um tom vermelho (Trewavas, 1983). Esta coloração opõe-se ao cinzento exibido pelos machos não reprodutores e pelas fêmeas.

O policromatismo é bastante comum entre os ciclídeos, fornecendo em muitas circunstâncias a indicação de quais os indivíduos dominantes e/ou sexualmente maduros. Existem inclusivamente espécies em que os machos podem exibir diferentes colorações nupciais quando se encontram sexualmente maduros, produzindo dois tipos de coloração distintos em diferentes indivíduos sem fenótipos intermédios (Heiligenberg, 1965). Nalgumas espécies, como no ciclídeo arco-íris (*Herotilapia multispinosa*), diferentes colorações surgem associadas a determinadas actividades comportamentais (Baylis, 1974), o que reflecte uma função social e um processo de comunicação intra-específica extremamente elaborado. Assim, embora este grupo possa estabelecer vias de comunicação química (exemplos em: Crapon de Caprona, 1974; Giaquinto & Volpato, 1997) ou sonora (Marshall, 1971; Marshall, 1972; Lanzing, 1974; Nelissen, 1978; Rowland, 1978), não é

surpreendente que a comunicação visual seja preponderante (Fernald, 1984).

As diferenças morfológicas entre machos e fêmeas em *O. mossambicus* não são restritas a variações na cor. Os machos apresentam a região mandibular bastante mais desenvolvida do que as fêmeas e as suas barbatanas anal e dorsal são também mais afiladas.

A tilápia moçambicana reproduz-se continuamente em latitudes tropicais e sazonalmente nas zonas subtropicais e temperadas, dependendo a frequência de emissão das posturas da temperatura. Este potencial reprodutor, que numa situação ideal permite que uma fêmea possa emitir posturas sucessivas com apenas 40 dias de intervalo, torna esta espécie (assim como outros elementos da mesma família) num óptimo modelo biológico para estudos de reprodução.

No início da época de reprodução, os machos reprodutores juntam-se e deslocam-se para zonas menos profundas, formando arenas reprodutoras onde constroem e defendem o seu ninho. Nesta espécie, os territórios defendidos pelos machos são compostos na zona central por ninhos que estes escavam com a boca, onde têm lugar as cerimónias de acasalamento. A dimensão dos ninhos varia com a dimensão dos indivíduos que os constroem e com o espaço disponível. Os substratos ideais à construção dos ninhos são arenosos, com vegetação dispersa, e com zonas acessórias menos profundas com vegetação mais densa (Trewavas, 1983). Os territórios são apenas defendidos durante o dia, uma vez que durante o período nocturno, os machos de *O. mossambicus* abandonam as zonas litorais onde construíram os seus ninhos e deslocam-se para águas mais profundas para protecção.

Na tilápia moçambicana, os pares reprodutores são formados pouco antes da reprodução. Após a fecundação da postura fêmeas e machos afastam-se de novo. Noutras espécies de ciclídeos, os pares são formados alguns dias antes da reprodução (Yanagisawa & Nishida, 1991; Mackereth & Keenleyside, 1993) e a tarefa de defesa do território onde ocorre a postura pode ser desempenhada pelos dois elementos de cada par, como acontece com *Cichlasoma nigrofasciatum* (Mackereth & Keenleyside, 1993). Nesta espécie, e ao contrário do que é referido para *O. mossambicus*, assim que os territórios são definidos, são mantidos até final da época de reprodução. Durante este processo, a fêmea que se encontra a guardar o ninho, consegue reconhecer o seu companheiro, mesmo que seja durante a noite, na total ausência

de estímulo visual (Reebs, 1994). Em contraste, no boca-de-fogo (*Cichlasoma meeki*) a defesa ser feita pelo par ou apenas pelo macho parental (Neil, 1984).

Em situações naturais, em *Oreochromis mossambicus*, existem algumas diferenças na distribuição espacial entre sexos, em que as fêmeas habitam em águas sub litorais e apenas visitam as arenas dos machos quando estão maduras e sexualmente receptivas. Estas são atraídas para os ninhos através de uma sequência comportamental de corte desenvolvida pelos machos. O comportamento reprodutor é caracterizado por uma formação em T desempenhada pelos dois intervenientes, em que o macho ocupa a posição horizontal (Trewavas, 1983). A fêmea deposita os ovos no centro do ninho e recolhe-os imediatamente com a boca, armazenando-os numa bolsa mandibular. Como a fêmea recolhe os ovos antes do macho ter oportunidade de os fecundar, os incubadores bucais têm que ultrapassar a dificuldade adicional que se prende com a fertilização dos ovos.

Nesta espécie, assim como noutras espécies de incubadores bucais, a fecundação é em geral feita dentro da boca da fêmea, ocorrendo por vezes a estimulação da papila genital masculina por parte desta, o que facilita a libertação do esperma (exemplo em Wickler, 1965). Após fecundados os ovos (o que é facilitado por movimentos mastigatórios da fêmea), as fêmeas afastam-se em conjunto para águas mais profundas, formando cardumes de fêmeas reprodutoras. Os ovos eclodem entre o 3º e o 5º dias, e permanecem na boca da mãe até adquirirem natação activa (10-14 dias após a fecundação). Adquirida a mobilidade natatória, os juvenis continuam a alojar-se na boca da mãe sempre que surgem situações de perigo até ao final do primeiro mês de vida, nadando junto à progenitora no resto do tempo. Quando uma fêmea se encontra a incubar, a sua agressividade aumenta à medida que o desenvolvimento da postura progride, pelo menos na fase final de desenvolvimento da prole, quando os juvenis adquiriram já capacidade natatória e se alimentam exogenamente (Oliveira & Almada, 1998b).

Em geral, as fêmeas de tilápia moçambicana e as de outras espécies com idênticas estratégias de reprodução, parecem não se alimentar durante o período em que se encontram a incubar ou a fornecer cuidados parentais. A motivação para incubar a postura, que reduz a necessidade de alimento para cerca de metade do normal, desaparece em pouco

tempo após a postura ter sido retirada, o que acontece também com *Pseudocrenilabrus multicolor* (Mrowka, 1986). No entanto, existem alguns relatos de ciclídeos incubadores bucais maternos em que as fêmeas se alimentam durante este período. Em *Cyphotilapia frontosa*, não só as fêmeas que se encontram a incubar uma postura apresentam alimento no tubo digestivo na proporção de um quarto em relação a fêmeas não reprodutoras, como os próprios juvenis, ainda dentro da boca da mãe e com saco vitelino associado, parecem ingerir algum do alimento materno (Yanagisawa & Ochi, 1991).

Na tilápia moçambicana a formação de pares não dura mais do que o necessário para que os ovos sejam fecundados (Oliveira, 1995). Embora os incubadores bucais maternos sejam geralmente classificados como poligínicos (Hert, 1989; Kuwamura *et al.*, 1989), *O. mossambicus* é caracterizada como uma espécie promíscua, uma vez que os pares sexuais não são duradouros e podem procriar mais do que uma vez com diferentes parceiros. Numa situação de cativeiro, a constituição dos grupos em *O. mossambicus* parece ser mais estável se obedecer a um regime poligínico, evitando confrontos violentos entre machos territoriais. Não existe, no entanto, a obrigatoriedade de utilização dos mesmos machos em épocas de reprodução sucessivas por parte das fêmeas reprodutoras numa situação natural. De facto, nalguns ciclídeos, as fêmeas podem visitar um ou mais machos nos seus territórios na mesma época de reprodução, transportando depois os ovos fertilizados na boca para longe do território destes machos (Yanagisawa, 1993). No caso da tilápia moçambicana, a fêmea tende a ser mais selectiva que o macho, uma vez que é quem mais investe na reprodução (Oliveira, 1995). No entanto, existem espécies próximas cujas fêmeas incubam posturas com descendentes de diferentes paternidades (exemplo em Hulata *et al.*, 1981). Por outro lado, o processo de selectividade na escolha do parceiro pode ser parcialmente invertido em espécies em que ambos os sexos investem em cuidados parentais. Nalguns ciclídeos biparentais, por exemplo, também o macho apresenta alguma selectividade na escolha das suas parceiras. Em *C. nigrofasciatum*, o macho parece basear a sua escolha da fêmea, em primeiro lugar pelo seu estado de maturação e em segundo lugar pela sua dimensão (Nuttall & Keenleyside, 1993), optando por fêmeas maiores em detrimento de fêmeas mais pequenas que se encontrem em estádios de ovulação avançados.

1.4.2 CICLO ENDÓCRINO REPRODUTIVO

Embora já nos anos sessenta se fizessem algumas quantificações de hormonas esteróides a partir do plasma sanguíneo de peixes teleósteos, só em meados dos anos setenta foi referida uma relação entre a variação de algumas hormonas (fundamentalmente androgénios) e a reprodução de um teleósteo (Katz & Eckstein, 1974). As alterações no perfil de hormonas sexuais podem ser detectadas em algumas espécies de tilápias (exemplo para *O. niloticus*) desde o início do seu ciclo de vida, mesmo quando as gónadas estão ainda indiferenciadas, provavelmente associadas à diferenciação sexual (Hines *et al.*, 1999). Tem também sido sugerido que a elevada concentração de T e E₂ presente nos ovos na primeira semana de desenvolvimento tem origem materna resultante da acumulação destas substâncias no ovário antes e durante o crescimento vitelogénico (Rothbard *et al.*, 1987), com um aumento da produção endógena a partir da sexta semana de vida (Rothbard *et al.*, 1987). Deste modo, no início do ciclo de vida na tilápia, a variação da T e do E₂ decaem numa fase inicial, que corresponde a uma fase de consumo de substâncias acumuladas no ovo, para mais tarde voltarem a subir.

O ciclo sexual feminino em tilápia é relativamente complexo e a sua duração depende da interrupção ou não da incubação da postura. Esta interrupção pode ser natural, uma vez que a fêmea pode não entrar em ovulação ou os seus ovócitos não serem fecundados, ou pode ser simulado artificialmente através da remoção da postura assim que esta é emitida pela fêmea. Esta situação vai implicar na fêmea a supressão do comportamento de protecção à descendência e o conseqüente início de um novo ciclo de desenvolvimento das gónadas. Os níveis das hormonas esteróides em fêmeas não reprodutoras são diferentes dos das fêmeas reprodutoras, como acontece com *Tilapia aurea* em que os níveis de E₂ são cerca de 10 vezes inferiores aos verificados para as fêmeas reprodutoras (Terkatin-Shimony & Yaron, 1978).

Smith e Haley (1988) acompanharam o perfil hormonal de 4 esteróides (T, E₂, progesterona e 17-hidroxiprogesterona) ao longo de um ciclo sexual de *O. mossambicus*, quer para fêmeas a incubar uma postura, quer para fêmeas não reprodutoras. Além da diferença de dimensões do ciclo, as fêmeas reprodutoras cessaram o crescimento vitelogénico dos ovócitos para

desta forma pouparem energia, enquanto forneciam cuidados parentais à descendência. Vinte e cinco dias após a emissão da postura (altura da sua libertação), os níveis de T e de E_2 subiam, atingindo um máximo, e o crescimento dos ovócitos era retomado (Smith & Haley, 1988). Um padrão de variação relativamente parecido foi descrito em *O. niloticus* para os perfis de E_2 e T (Tacon *et al.*, 2000), embora com algumas diferenças.

Em fêmeas não incubadoras, foi registado para ambas as espécies um aumento dos níveis de E_2 após a remoção das posturas, correspondente ao crescimento vitelogénico. Os níveis de T correlacionam-se também com a vitelogénese e podem ser justificados por este esteróide ser precursor do E_2 (Smith & Haley, 1988; Tacon *et al.*, 2000). Em espécies em que a incubação bocal é assegurada pelos machos, o perfil das hormonas sexuais (T e E_2) é também afectado pela incubação da descendência, iniciando-se num nível baixo quando os ovos são recolhidos e aumentando gradualmente após o sexto dia até à libertação da descendência (Kishida & Specker, 2000).

1.4.3 ENDOCRINOLOGIA DO COMPORTAMENTO

As hormonas sexuais influenciam o comportamento sexual de vários grupos de vertebrados (Balthazart *et al.*, 1996b; Panzica *et al.*, 1996) incluindo os peixes, onde podem funcionar como modeladores sociais (Borges *et al.*, 1998). A influência dos esteróides sexuais pode ser exercida não só a nível comportamental de forma directa, como também afectando as estruturas envolvidas na reprodução como acontece com a morfologia da papila genital de algumas espécies (Oliveira & Almada, 1998a; Carlisle *et al.*, 2000). Mais ainda, os polimorfismos por vezes apresentados por diferentes machos da mesma espécie (como acontece com *Parablennius sanguinolentus parvicornis*) reflectem diferentes estratégias de reprodução e estão directamente correlacionados com os níveis de 11-cetotestosterona (11-KT), em que os machos que mais activamente competem pelo acasalamento são também os que apresentam maiores níveis deste androgénio (Oliveira *et al.*, 2001b). A 11-KT é o androgénio predominante e mais potente nos machos da maioria dos teleósteos, actuando sobre a espermatogénese e o comportamento sexual e social (Borg, 1994;

Oliveira & Almada, 1998a; Oliveira *et al.*, 2001a).

Em teleósteos, incluindo *O. mossambicus*, a interação entre os androgénios e o comportamento parece funcionar nos dois sentidos. Por um lado, o comportamento social modela os níveis de androgénios produzidos pelos indivíduos de acordo com o estatuto social atingido por cada um na hierarquia de um grupo (Oliveira *et al.*, 1996). Assim, indivíduos com maior nível de androgénios, além de ocuparem posições hierárquicas superiores, revelam também maior sucesso na defesa dos territórios, constroem ninhos maiores, exibem caracteres sexuais secundários mais exuberantes e uma maior taxa de comportamentos de corte quando na presença de fêmeas em ovulação (Oliveira *et al.*, 1996). Esta situação parece suportar a “hipótese do desafio” (Wingfield, 1984), que defende que as flutuações a curto prazo na concentração dos androgénios em machos de vertebrados podem ser moduladas por interações sociais. Por outro lado, o nível de androgénios em circulação no plasma determina o aparecimento de caracteres sexuais secundários e afecta também os padrões de comportamento sexual envolvidos na reprodução de *O. mossambicus* (Oliveira & Almada, 1998a). Oliveira e Almada (1998a) apoiam ainda um modelo causal para o papel dos androgénios como mediadores da modelação social dos caracteres sexuais secundários e, conseqüentemente, da reprodução da espécie. Deste modo, indivíduos dominantes, com níveis de androgénios mais elevados, apresentarão maiores probabilidades de se reproduzirem do que indivíduos com posições hierárquicas inferiores, já que estes não exibem este tipo de características de forma tão acentuada, nem têm as suas gónadas em idênticos estádios de desenvolvimento. Por outro lado, noutra tilápia (*Tilapia zillii*), o índice gónado-somático parece estar positivamente correlacionado com a vitória em confrontos com conspecíficos (Neat *et al.*, 1998), mas não foi encontrada qualquer relação entre os níveis de androgénios (T e de 11-KT) e a vitória em confrontos agonísticos, o que pode ser devido ao regime social (monogamia) (Neat & Mayer, 1999), diferente do de *O. mossambicus*.

Não só as interações de um determinado indivíduo determinam o seu comportamento, modulando a produção de androgénios, mas também o sistema endócrino dos indivíduos espectadores responde a interações sociais em que não participam (Oliveira *et al.*,

2001c). Por outro lado, a experiência anterior facilita o ajustamento a situações sociais subsequentes, desempenhando os androgénios um papel de modelador dos mecanismos cognitivos de comunicação (Oliveira *et al.*, 2001c).

No entanto, não são apenas os androgénios a sofrerem alterações de concentração, como resultado de interacções sociais. Por exemplo, na truta arco-íris, os níveis de $17,20\beta$ -P em machos reprodutores aumenta quando na presença de fêmeas em ovulação (Liley *et al.*, 1986), enquanto que em *O. mossambicus* as concentrações de $17,20\alpha$ -P e de $17,20\beta$ -P revelam elevadas correlações com os comportamentos sexuais e agonísticos dos machos (Oliveira *et al.*, 1996). Estas relações podem estar relacionadas com a aceleração do desenvolvimento das gónadas em machos dominantes e à importância destas hormonas no processo reprodutor masculino (Oliveira *et al.*, 1996).

Os esteróides sexuais não são os únicos intervenientes hormonais a mediar comportamentos de corte. Por exemplo, o neuropéptido hipotalâmico arginina-vasotossina (AVT), que desempenha também em vertebrados superiores um papel importante na fisiologia reprodutiva, influencia, nos machos parasitas (*sneakers*) de blénios (*Salaria pavo*) a coloração nupcial e a duração dos rituais de corte femininos dirigidos a machos parentais (Carneiro *et al.*, 2003). A actuação da AVT parece ainda estar relacionada com as estratégias de reprodução em que machos com diferentes morfótipos desenvolvem numa espécie (Miranda *et al.*, 2003). O sistema AVT é, pelo menos em parte, controlado por estímulos sociais específicos em teleósteos, independentemente do funcionamento das gónadas (Semsar & Godwin, 2003), embora este sistema seja directamente controlado por acção das hormonas esteróides.

Como acontece nos mamíferos, a diferenciação sexual dos indivíduos depende da actuação das hormonas esteróides. A produção de T a partir dos testículos em diferenciação actua no sistema nervoso central, produzindo uma alteração da estrutura do cérebro e condicionando a sua capacidade de reconhecer estímulos específicos na fase adulto. Em muitas situações, a masculinização dos núcleos cerebrais depende da aromatização local de T a E_2 , como acontece na área pré-óptica do hipotálamo. O tratamento por androgénios em *O. mossambicus*, bem como em espécies próximas é preponderante no processo de

diferenciação sexual, podendo mesmo reverter o sexo dos indivíduos quando administrados em períodos sensíveis específicos do desenvolvimento embrionário (Clemens & Inslee, 1968; Hunter & Donaldson, 1983). Embora a T seja crucial no processo de diferenciação sexual e na activação dos comportamentos sexuais em adultos, a sua completa expressão pode passar pela conversão em estrogénios, actuando estes mediados por receptores específicos. Esta conversão é desempenhada pelo citocromo P450-aromatase, enzima codificada pelo gene *Cyp19*.

1.5 A SUPER – FAMÍLIA DO CITOCROMO P450

O termo citocromo P450 é utilizado para referir uma vasta família de heme-proteínas que podem ser encontradas numa grande diversidade de organismos vivos. A sua presença estende-se desde os procariotas ancestrais, que inicialmente existiam numa atmosfera com características redutoras (Nebert & Feyereisen, 1993), plantas onde alguns membros da família desempenham funções importantes a nível de metabolismo de produtos fisiológicos e de pesticidas (Durst *et al.*, 1993), e encontra-se também largamente difundido em todo o reino animal. A presença de enzimas pertencentes ao citocromo P450 pode ocorrer dentro das células em duas zonas distintas: na fracção microsomal e na mitocondrial.

As proteínas pertencentes ao citocromo P450 são codificadas por uma super família de genes cujo número atinge algumas centenas. A importância deste grupo de proteínas pode ser ilustrada tendo em conta as reacções catalisadas pelo citocromo P450 na síntese de hormonas esteróides a partir do colesterol, no córtex supra-renal e nas gónadas. São necessárias diferentes enzimas pertencentes ao citocromo P450 para converter colesterol em aldosterona ou em cortisol no córtex supra-renal e também para produzir T e E₂ nos órgãos sexuais e nalguns outros tecidos periféricos.

A reacção geral catalisada pelo citocromo P450 pode ser escrita da seguinte forma:



Nesta reacção, o substrato S pode ser representado por um esteróide ou por qualquer outra

substância química que apresente na sua constituição um alcano, um alceno, um anel aromático ou um anel heterocíclico que possa servir como substrato para oxigenação. Todas as proteínas pertencentes a este citocromo são proteínas conjugadas cujo grupo prostético é um grupo heme. A Figura 2 mostra detalhadamente a conversão da T em E_2 .

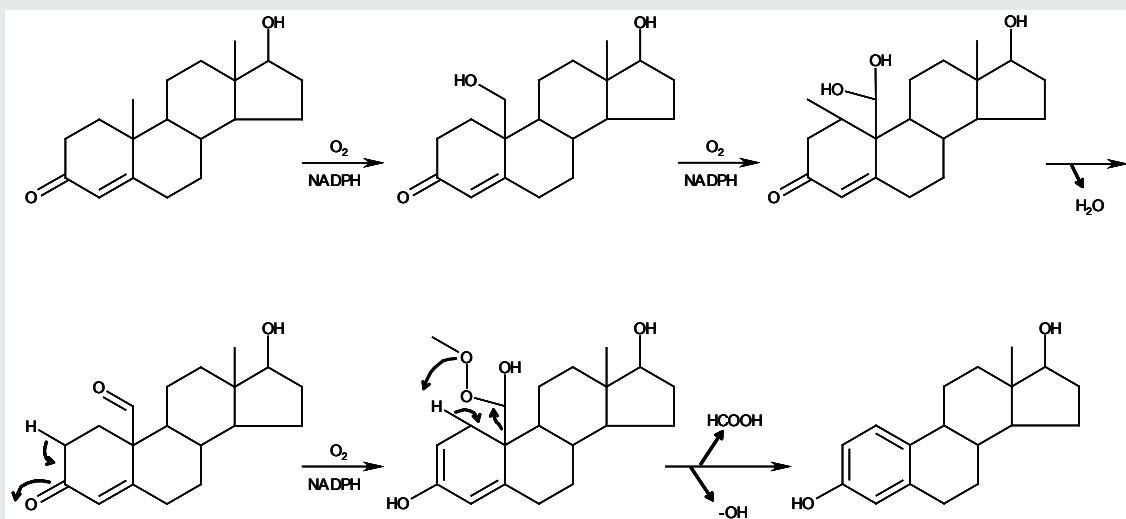


Figura 2 – Esquema representativo da conversão de testosterona em 17β-estradiol (adaptado de Lephart, 1996)

1.5.1 CITOCROMO P450-AROMATASE

Os estrogénios são uma família de esteróides sexuais que pode ser sintetizada numa grande variedade de tecidos, sendo o ovário, o principal local da sua síntese. O padrão de produção dos estrogénios a partir dos ovários ocorre de uma forma cíclica (Bulun *et al.*, 2000). O principal estrogénio com origem no ovário é o E_2 , sintetizado a partir de androgénios nas células da teca, difundindo-se estes, para as células da granulosa onde se expressa a aromatase. A FSH liga-se ao seu receptor nas células da granulosa aumentando a produção de monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) intracelular, o que induz a ligação de dois factores de transcrição ao promotor proximal II do gene *Cyp19*. Este processo activa a transcrição da enzima P450-aromatase, a síntese da proteína e a consequente conversão de androgénios em estrogénios (Bulun *et al.*, 2000).

Da actividade da enzima aromatase resulta E_2 se o substrato utilizado for a T ou estrona (E_3) se for a androstenediona (A). No ovário, o precursor principal é a testosterona (Nishihara *et al.*, 2000), enquanto a A é o principal substrato nos tecidos periféricos, como o tecido adiposo e a pele, produzindo E_3 , que pode ainda ser convertida em E_2 (Bulun *et al.*, 2000). Após a transformação dos androgénios nos seus estrogénios correspondentes, estes podem ainda ser metabolizados em regiões neurais específicas (como o hipotálamo e a pituitária) e têm como produtos os catecol-estrogénios, que podem desta forma actuar quer como catecolaminas quer como estrogénios, ligando-se a ambos os receptores específicos para cada tipo de moléculas (Lephart, 1996). Deste modo, os catecol-estrogénios podem modelar a regulação da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), através da interacção com o sistema das catecolaminas, podendo por outro lado ligar-se aos receptores de estrogénios (embora com menor actividade) e regular a LH e, conseqüentemente, o comportamento sexual (Lephart, 1996). Desta forma, tanto a sua área de actuação no sistema nervoso central, bem como as funções que desempenham a nível dos mecanismos fisiológicos são ampliadas. Na codorniz japonesa (*Coturnix japonica*), a enzima estrogénio-2-hidroxilase, que medeia a produção de catecol-estrogénios, colocaliza-se no cérebro com a aromatase, o que parece indicar uma via alternativa de actuação dos estrogénios no sistema nervoso central (Balthazart *et al.*, 1994a). Por outro lado, parece haver uma inter relação entre a formação de catecol-estrogénios e o estabelecimento da gravidez no porco (Chakraborty *et al.*, 1989), em que os catecol-estrogénios parecem mediar algumas das acções relacionadas com o início da gestação (Mondschein *et al.*, 1985).

Enquanto que o papel das gonadotrofinas na regulação da P450 aromatase nas gónadas está estabelecido, a regulação da aromatase nos tecidos periféricos envolve um processo menos claro e mais complexo. Existem vários factores responsáveis pela transcrição e regulação deste gene nos diferentes tecidos, como será debatido nas próximas secções.

1.5.1.1 Regulação do gene *Cyp19*

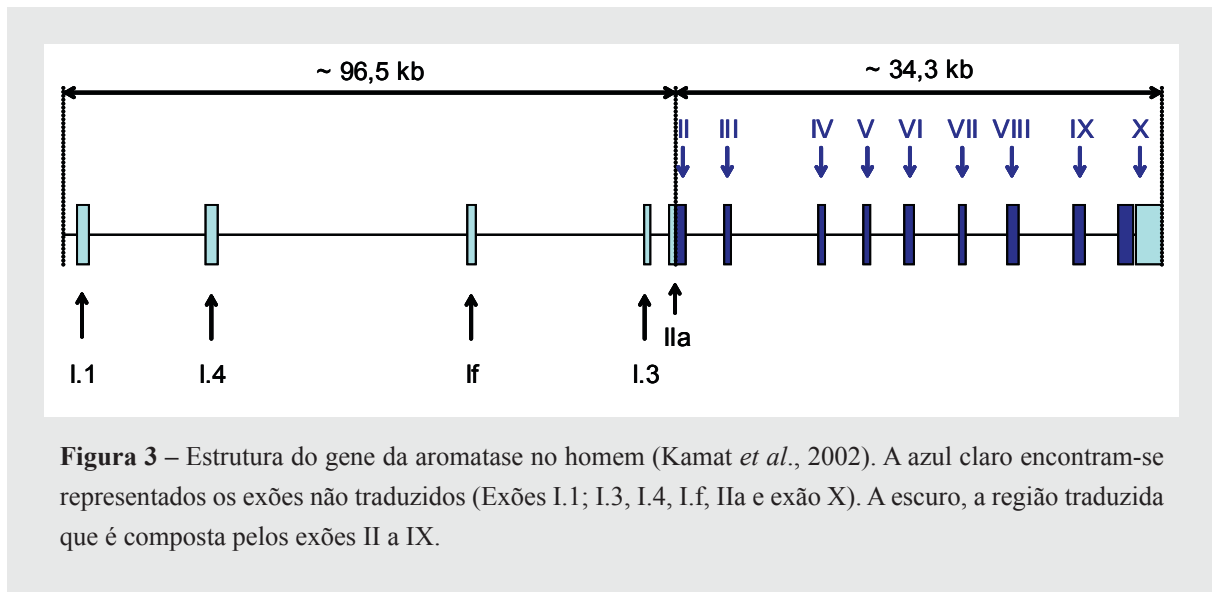
Os processos que envolvem a activação de um determinado gene são em geral complexos, com um grande conjunto de intervenientes que introduzem múltiplas possibilidades de regulação. A regulação pode ser efectuada ao nível da transcrição ou num processo pós-transcricional, onde podem estar implicados mecanismos de retroacção positiva ou negativa por um ou vários intervenientes. Na aromatase, a transcrição pode ser regulada por diferentes factores que actuam, no caso dos humanos, em promotores específicos associados a um primeiro exão não traduzido cuja expressão varia de tecido para tecido (Harada *et al.*, 1993; Balthazart *et al.*, 1994b).

1.5.1.1.1 REGULAÇÃO DO GENE *CYP19*

POR ACÇÃO DE PROMOTORES TECIDULARES ESPECÍFICOS

O gene da aromatase humana é composto por dez exões (Figura 3) (Harada *et al.*, 1990), incluindo o primeiro exão que não é traduzido, e que é excisado por *splicing* alternativo. A proteína funcional é codificada pelos restantes exões (exões 2 a 10), embora o último exão não seja traduzido a totalidade. A estrutura genómica completa do *Cyp19* em humanos tem cerca de 130kb, com a região não traduzida a estender-se por aproximadamente 97kb (Kamat *et al.*, 2002).

O gene *Cyp19* expressa-se nos ovários (Kirilovas *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 1997; Saldanha & Schlinger, 1997), testículos (Saldanha & Schlinger, 1997; Carreau *et al.*, 2001), placenta (Mahendroo *et al.*, 1991; Lobo & Bellino, 1989), tecido adiposo (Zhao *et al.*, 1995a; Agarwal *et al.*, 1997), pele (Leshin *et al.*, 1981; Leshin *et al.*, 1983; Longcope *et al.*, 1983; Schlinger *et al.*, 1989; Harada, 1992), osso (Vanderschueren *et al.*, 1997; Shozu *et al.*, 1998; Carreau, 2000), cérebro (Sanghera *et al.*, 1991; Balthazart *et al.*, 1990a) e em diferentes tecidos embrionários e fetais (Toda *et al.*, 1994; Andrews *et al.*, 1997; Simpson *et al.*, 1997). No Homem, cada um destes transcritos é iniciado por um exão específico que pode, no entanto, repetir-se em mais do que um tecido, e a sua regulação nos diferentes tecidos depende de diferentes factores de controlo.



A montante do primeiro exão do gene da aromatase existem um conjunto de sequências de consenso a que se ligam factores de controlo que regulam a transcrição da aromatase de uma forma particular em cada tecido (Evrard *et al.*, 2000), o que faz com que o *Cyp19* seja o primeiro membro da super família de genes citocromo P450, e um dos poucos genes eucariotas, regulados por diferentes promotores específicos consoante o seu local de expressão (Kamat & Mendelson, 2001). Deste modo, a activação ou inactivação da transcrição do *Cyp19* é controlada por diferentes factores consoante o seu local de síntese.

Este primeiro exão repete-se ao longo da região não traduzida do gene e cada forma deste exão encontra-se posicionada a diferentes distâncias do local de início da transcrição no exão II. Consoante o tecido em que o gene *Cyp19* tem de ser transcrito, um determinado factor de transcrição ligar-se-á a uma sequência de consenso a montante de uma forma específica deste primeiro exão e que varia de tecido para tecido. Na placenta, a expressão da aromatase depende da utilização de um de dois possíveis exões não traduzidos (exões I.1 e I.2), cujos locais de início da transcrição ficam situados a sensivelmente 100.000pb acima do local de início da tradução no exão II (Mahendroo *et al.*, 1991). Os transcritos da aromatase associados ao tecido adiposo são promovidos pelos exões I.3 e I.4 que se apresentam muito distanciados entre si (250pb e 70.000pb antes do local de tradução no exão II, respectivamente), no cérebro pelo exão I.f (a 40000pb do início da tradução) e nas gónadas o exão responsável é também outro (exão IIa) e encontra-se apenas a 39pb do

início do exão II (revisão em Kamat *et al.*, 2002).

A grande dimensão do gene implica uma grande diferença entre o posicionamento de alguns exões ao longo de toda a sua extensão. O transcrito da placenta que contém o exão I.1, encontra-se muito mais afastado do exão II do que por exemplo o exão IIa, localizado imediatamente antes do local de início de tradução e que é específico para o ovário. Esta distância, que difere entre os dois promotores, sugere que o primeiro poderá ter sido recrutado numa fase mais tardia do seu percurso evolutivo, o que terá acontecido com a evolução dos primatas (Kamat & Mendelson, 2001). Comparando diferentes grupos animais, parece haver uma fraca homologia na sequência do primeiro exão, existindo no entanto conservação funcional, o que parece indicar um processo de evolução convergente do gene *Cyp19* nas diferentes classes de vertebrados (Kamat *et al.*, 2002).

A região que define o local de início da transcrição do *Cyp19* situa-se a montante de cada exão I e na placenta corresponde a aproximadamente 500pb. O mesmo foi também verificado para a região promotora do exão II.a, em que uma sequência com apenas 278pb que flanqueia a região 5' deste exão medeia a expressão específica do ovário, enquanto que 348pb da região 5' que flanqueia o exão I.4 dirige a expressão no tecido adiposo e na pele em murganhos transgênicos (Hinshelwood & Mendelson, 2001).

Embora o cérebro dos vertebrados superiores e inferiores apresente uma expressão elevada de *Cyp19* em diferentes núcleos, da amplificação das extremidades 5' dos transcritos de mRNA presentes no hipotálamo e na amígdala apenas foi detectado o transcrito resultante da utilização do exão I.f (Kamat *et al.*, 2002). Há um elevado grau de conservação em diferentes espécies animais das regiões do DNA genómico que flanqueiam os primeiros exões I.f e II.a, sugerindo a importância fundamental que a aromatase desempenha no hipotálamo e na amígdala (Kamat *et al.*, 2002).

A regulação do *Cyp19* não se deve apenas a promotores específicos para cada tecido. A expressão de aromatase em diferentes tecidos periféricos está também dependente de factores específicos reguladores da transcrição nesses tecidos. Entre estes factores incluem-se as hormonas esteróides e outras hormonas hipofisárias (Boerboom *et al.*, 1999). Por exemplo,

durante o período de gestação nos ratos, os níveis de mRNA e da proteína são mantidos baixos na primeira metade da gravidez por acção da prolactina, podendo ser modulados a meio da gestação pela LH, atingindo níveis elevados na segunda metade da gestação, mediada por factores da placenta (lactogénios placentários 1 e T) (Hickey *et al.*, 1989).

A expressão da aromatase no ovário utiliza um promotor proximal que é regulado pelo cAMP. No ovário esta expressão é regulada nas células da granulosa e nas células luteais em diferentes estádios do ciclo ovárico. Inicialmente, estas células são reguladas pela FSH e LH, respectivamente, que activam a adenilato ciclase e aumentam a produção de cAMP nas células alvo (Steinkampf *et al.*, 1987). Análogos do cAMP e factores de crescimento são também estimulados pela FSH, que induzem o aumento da actividade da aromatase nas células da granulosa (Dorrington *et al.*, 1987). Este processo regula a actividade da enzima ao nível da transcrição do mRNA.

A placenta, que utiliza um promotor mais afastado da origem da transcrição, é regulada de forma mais complexa por retinóides (Simpson *et al.*, 1997). Neste tecido, que é a principal fonte de produção de estrogénios durante a gravidez, a actividade da aromatase parece ser influenciada pela produção de insulina e de factor de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), o que se reflecte num decréscimo de produção de estrogénios neste período em mulheres portadoras de diabetes (Nestler, 1987). Os análogos de cAMP foram referidos como apresentando estimulação da aromatase nas células da placenta (Lobo & Bellino, 1989). Os exões I.3 e IIa parecem ser regulados pelo cAMP, enquanto que o exão I.4, responsável pela expressão no tecido adiposo (tal como o promotor I.3), depende da presença de glucocorticóides como estimuladores (Simpson *et al.*, 1981) que actuam concertadamente com citoquinas (Zhao *et al.*, 1995b; Simpson *et al.*, 2000). Nos hepatócitos fetais, onde a aromatase é também transcrita com o exão I.4, a enzima é também regulada por glucocorticóides (Lanoux *et al.*, 1985).

A regulação do citocromo P450 aromatase no cérebro pode em parte ser modulada por neurotransmissores como catecolaminas ou por neuropéptidos que actuam também por activação de um sistema de mensageiros secundários como o cAMP (Balthazart & Ball, 1998). Estudos realizados *in vitro* com homogenados da área pré-óptica do hipotálamo de

codorniz japonesa com o intuito de compreender a actuação das catecolaminas na actividade da aromatase, revelaram que a norepineferina parece não interferir com a actividade enzimática da aromatase, mas que a dopamina diminuiu em mais de 40% a sua actividade, actuando de forma inibitória nesta área específica do cérebro (Baillien & Balthazart, 1997).

1.5.1.1.2 REGULAÇÃO HORMONAL DA AROMATASE

A regulação da expressão do gene *Cyp19* em vertebrados por acção dos androgénios está actualmente bem documentada (revisão em Ball & Balthazart, 2004). A sua regulação no cérebro parece ser, no entanto, bastante complexa e dependente de diferentes factores. Por um lado, parece claro que os androgénios aumentam a expressão do *Cyp19* no hipotálamo dos peixes e das aves, enquanto que em mamíferos, ambos os efeitos estimulador e inibitório foram já referidos (Lephart, 1996). Em roedores e aves, a T medeia a transcrição da aromatase em algumas regiões do cérebro com importância na regulação de funções neuroendócrinas (Roselli & Resko, 2001; Schumacher & Balthazart, 1986; Balthazart *et al.*, 1990b). Um dos efeitos da T é o aumento dos neurónios hipotalâmicos que expressam aromatase, actuando a nível pré-transcricional e não apenas influenciando a cinética da reacção (Hutchison *et al.*, 1995; Balthazart & Foidart, 1993). No cérebro do macaco (*Macaca fascicularis*), todas as regiões cerebrais que expressam aromatase (hipotálamo e sistema límbico), expressam também receptores de androgénios (Roselli *et al.*, 2001), o que suporta a implicação dos androgénios no mecanismo regulador da aromatase.

Em mamíferos, também os estrogénios regulam a actividade da aromatase a nível pós-transcricional, (Abdelgadir *et al.*, 1994). Na área pré-óptica do hipotálamo da codorniz japonesa, não só a T mas também o E_2 aumentam a actividade da aromatase na ordem de 300-500%, a concentração do seu mRNA, bem como o número de células imunorreactivas à enzima (Panzica *et al.*, 1996; Balthazart & Ball, 1998). Isto sugere que, pelo menos em algumas regiões do cérebro (sistema límbico), os androgénios não são as únicas hormonas esteróides a regular a actividade da aromatase, mas sim uma acção concertada de androgénios e estrogénios (Roselli *et al.*, 1997; Balthazart & Ball, 1998). A T e a 5 α -dihidrotestosterona

(DHT) regulam também a expressão da aromatase noutros tecidos como nos fibroblastos da pele, incluindo na região genital (Chabab *et al.*, 1986; Berkovitz *et al.*, 1990).

Em contraste, a castração e o tratamento de machos de codorniz japonesa com T (que também aumenta o E₂ a nível local), não parece afectar nem o número de células imunorreactivas para aromatase na região do corno dorsal da espinal-medula das aves, nem a actividade da aromatase medida em diferentes posições anatómicas (Evrard *et al.*, 2000), sugerindo que nesta região do sistema nervoso central a regulação da enzima não parece ser feita pela T e abrindo a hipótese de esta ser controlada por estímulos neuronais (Blomqvist, 2000). Suspeita-se, por outro lado, que a produção de estrogénios pela aromatase pode influenciar o metabolismo de neurotransmissores (Balthazart & Ball, 1998), pelo que a sua função nestas células da corda dorsal pode não ter a ver apenas com a biossíntese de estrogénios (Blomqvist, 2000), mas também com a mediação dos estímulos neurais, não sendo por isso influenciada pela concentração de androgénios circulantes.

A expressão da aromatase foi já confirmada nos axónios e nas dendrites dos neurónios do sistema límbico e do hipotálamo (Naftolin *et al.*, 1996), assim como nos botões pré-sinápticos (Balthazart *et al.*, 1992; Balthazart & Foidart, 1993; Foidart *et al.*, 1994). Os estrogénios produzidos nestas regiões podem ser libertados e ligar-se a receptores específicos de células vizinhas, ou actuar localmente nas próprias células nervosas. A mesma situação foi descrita, em carácter de excepção, para a zona cortical da amígdala nos ratos e para a região telencefálica no mandarim, *Taeniopygia guttata* (passeriforme), em que a T não produziu nenhum aumento na actividade da aromatase (Vockel *et al.*, 1990a). Este resultado parece confirmar que a regulação hormonal é específica de determinadas regiões cerebrais, que estão directamente implicadas na activação e mediação de comportamentos sexuais, não sendo feita de uma forma generalizada.

A regulação do gene *Cyp19* depende ainda da fase do desenvolvimento em que a expressão tem lugar (Tobet & Hanna, 1997). A exposição a androgénios pode ser efectiva no aumento da actividade da aromatase na fase adulta, mas pode não produzir o mesmo efeito nas fases embrionárias ou juvenis (Weaver & Baum, 1991; revisão em Hutchison *et al.*, 1995). Em ratos na fase neonatal, por exemplo, a produção de estrogénios no cérebro

restringe-se essencialmente aos asterócitos e aos neurónios propriamente ditos, não tendo sido detectada a enzima nos oligodendrócitos (Zwain & Yen, 1999). Por outro lado, as hormonas sexuais que são segregadas durante a puberdade podem melhorar a expressão da actividade da enzima na idade adulta, contribuindo assim a T e os seus metabolitos para a modelação do cérebro em desenvolvimento, determinando a capacidade de aromatização de forma específica em machos e fêmeas (Roselli & Klosterman, 1998). Assim, nos mamíferos, a capacidade de resposta das diferentes regiões cerebrais à presença de androgénios, depende do ambiente endócrino a que os indivíduos estiveram sujeitos no início do seu desenvolvimento, determinado pelo seu género sexual.

1.5.1.2 Expressão do gene *Cyp19* no cérebro dos vertebrados superiores

A distribuição da expressão dos transcritos do gene *Cyp19* no cérebro dos vertebrados verifica-se de forma heterogénea e específica para diferentes regiões cerebrais.

Na determinação dos locais de expressão da P450-aromatase do cérebro têm sido utilizadas várias técnicas incluindo ensaios radiométricos com produção de água tritiada para localização da sua actividade, hibridação *in situ* para determinação da expressão do mRNA e imunocitoquímica para localização celular da proteína. Como resultado tem-se verificado que a P450-aromatase está associada essencialmente a diferentes núcleos do sistema límbico, como é o caso da região hipotalâmica no cérebro dos mamíferos (Foidart *et al.*, 1995a; Roselli, 1995; Roselli *et al.*, 2001; Roselli *et al.*, 1998b), da área pré-óptica (Foidart *et al.*, 1995a; Roselli, 1995; Roselli *et al.*, 2001; Roselli *et al.*, 1998b; Roselli *et al.*, 1998a), da amígdala (Foidart *et al.*, 1995a; Roselli, 1995; Roselli *et al.*, 2001; Roselli *et al.*, 1998b; Roselli *et al.*, 1998a; Roselli *et al.*, 1985), da região septal (Foidart *et al.*, 1995a), e do núcleo intersticial da estria terminal (BnST) (BnST Foidart *et al.*, 1995a; Roselli *et al.*, 2001; Roselli *et al.*, 1998b; Roselli *et al.*, 1998a; Roselli *et al.*, 1985). Mais precisamente, as células no cérebro que expressam transcritos de mRNA do gene *Cyp19* situam-se no núcleo pré-óptico médio do hipotálamo, nos núcleos da estria terminal e na zona mediana da amígdala (Roselli *et al.*, 1998b; Roselli *et al.*, 1998a).

No entanto, mesmo considerando apenas a região do hipotálamo uma das regiões mais importantes na mediação dos comportamentos sexuais, existem diferentes núcleos que podem expressar transcritos do gene com intensidades diferentes, como acontece com o núcleo hipotalâmico ventro-médio que apresenta expressão muito menos intensa do que o núcleo médio (Roselli *et al.*, 1998a). Também nas aves estas regiões parecem ser as que expressam os níveis mais elevados de aromatase (Balthazart *et al.*, 1991; Balthazart *et al.*, 1992; Balthazart & Foidart, 1993; Beyer *et al.*, 1994b)

Alguns autores, utilizando vertebrados inferiores como modelo (exemplo para *C. auratus*), revelaram que a sua distribuição é muito mais alargada do que as regiões do hipotálamo e do sistema límbico inicialmente indicadas, e referem a presença da aromatase em células do sistema sensorial, incluindo a retina (Gelinas & Callard, 1993).

O cérebro dos vertebrados é uma estrutura sexualmente dimórfica que resulta do processo ontogénico de desenvolvimento. Este dimorfismo sexual revela-se em mecanismos genéticos (Arnold, 1997) e na actuação de hormonas esteróides (como acontece com o E₂) que regulam a distribuição da expressão de diferentes genes no cérebro (Patchev *et al.*, 1995). A forma e dimensão das células, bem como a sua organização, varia com o sexo o que acaba também por ter uma consequência indirecta na sensibilidade que diferentes regiões apresentam à acção de certas hormonas (Brown *et al.*, 1999). Este dimorfismo sexual anatómico é indicativo da acção que as hormonas esteróides têm na activação das diferentes regiões do cérebro e traduz-se em dimorfismo sexual do ponto de vista fisiológico e comportamental (Brown *et al.*, 1999). Neste aspecto a distribuição da expressão do gene *Cyp19* é elucidativa, uma vez que não só é específica de algumas regiões em particular, como também ocorre de forma diferencial nestes núcleos do sistema nervoso central (SNC) de machos e fêmeas em relação a estes núcleos (Balthazart *et al.*, 1996b; Hutchison *et al.*, 1995). Tem sido argumentado que este dimorfismo pode não ser originado com base em mecanismos endócrinos, mas sim accionado por mecanismos genéticos mais ou menos directos como acontece com a formação dos testículos nos mamíferos, o que está dependente da expressão do gene SRY (Sex determining Region in the Y-chromosome) (Arnold, 1996). A teoria mais aceite refere, no entanto, que as

diferenças sexuais na anatomia do cérebro e também na sua função são accionadas com base na acção de esteróides produzidos nas gónadas durante o período embrionário e neonatal. Nos mamíferos, os esteróides testiculares accionam padrões masculinos de desenvolvimento neural, enquanto que os padrões de desenvolvimento neural femininos ocorrem na ausência destas secreções testiculares (Arnold, 1996).

Os mecanismos responsáveis pela diferenciação sexual dos núcleos cerebrais envolvidos no controlo dos comportamentos reprodutores têm sido estudados especialmente nos mamíferos (exemplos em Veney & Rissman, 2000; Veney & Rissman, 1998; Roselli *et al.*, 1998a; Roselli *et al.*, 1985) e nas aves (exemplos em Vockel *et al.*, 1990b; Arnold, 1997; Balthazart, 1997). Nos mamíferos, a T produzida pelos testículos durante a fase fetal condiciona a organização do cérebro e a futura orientação dos comportamentos sexuais. As diferenças na expressão da aromatase entre sexos parecem resultar (pelo menos em parte) da actuação da T (Hutchison *et al.*, 1995) através da ligação a receptores de androgénios (Beyer *et al.*, 1994a), o que aumenta a actividade da aromatase nos neurónios hipotalâmicos (Hutchison, 1997) e/ou dos seus metabolitos no cérebro em desenvolvimento (Roselli & Klosterman, 1998). Este processo condiciona a distribuição da aromatase na fase adulta e as respostas comportamentais dos indivíduos.

Em murganhos (*Mus musculus*) em desenvolvimento, durante o período perinatal, as principais fontes de expressão da aromatase localizam-se na área pré-óptica, em algumas regiões do hipotálamo e no sistema límbico, essencialmente na região da amígdala (Lauber & Lichtensteiger, 1994; Tsuruo *et al.*, 1994). A sua expressão diminui de intensidade à medida que os indivíduos se desenvolvem, com excepções na amígdala e no BnST (BnST, Lauber & Lichtensteiger, 1994). Foi ainda demonstrada, mesmo na fase neonatal, a ocorrência de transcritos e de actividade enzimática da aromatase no mesencéfalo embrionário (Raab *et al.*, 1995), para além do telencéfalo e do diencéfalo, onde tem uma distribuição mais geral.

Durante a diferenciação do cérebro de murganhos, a expressão do mRNA da aromatase no hipotálamo (Harada & Yamada, 1992) aumenta lentamente e atinge valores máximos na altura do nascimento, apresentando os machos maior actividade enzimática do que as

fêmeas (MacLusky *et al.*, 1987). No entanto, em ovelhas o período perinatal não parece revelar diferenças sexuais na expressão da enzima, pelo menos de forma contínua, embora a expressão detectada revele maior intensidade nos núcleos já referidos (hipotálamo e amígdala) (Roselli *et al.*, 2003), o que pode estar relacionado com as diferentes formas de expressão comportamental nos diferentes grupos.

As regiões onde se denota um maior dimorfismo sexual no cérebro dos vertebrados, são exactamente as mesmas que estão envolvidas na mediação dos comportamentos sexuais e que incluem o núcleo pré-óptico mediano e o BnST (Schumacher & Balthazart, 1986; Beyer *et al.*, 1994a; Roselli *et al.*, 1998a), com o macho a expressar a enzima com maior intensidade. A maior capacidade de aromatização dos machos na área pré-óptica pode ajudar também em parte a explicar a razão pela qual estes são comportamentalmente mais reactivos à T do que as fêmeas (Roselli *et al.*, 1997). Por outro lado, as fêmeas de roedores parecem apresentar maior quantidade de neurónios imunorreactivos aos receptores de estrogénios na zona central da área pré-óptica, sendo este padrão invertido no BnST (Veney & Rissman, 1998). Estas diferenças entre sexos são comuns a diferentes grupos de vertebrados, embora nem sempre seguindo o mesmo padrão de desenvolvimento (Foidart & Balthazart, 1995). Nas aves por exemplo, parece haver uma relação entre a expressão desta enzima e os núcleos cerebrais pertencentes ao sistema de controlo do canto (Vockel *et al.*, 1990b).

Por vezes, as zonas em que a aromatase é expressa no cérebro são acompanhadas por uma sobreposição da expressão dos receptores de estrogénios (Tsuruo *et al.*, 1995; Tsuruo *et al.*, 1996), embora esta sobreposição não seja absoluta. No núcleo mediano da área pré-óptica do hipotálamo da codorniz japonesa, apenas 20% das células que contêm aromatase expressam também receptores de estrogénios. No BnST este valor decresce para 4% (revisão em Absil *et al.*, 2001a), embora a sobreposição das duas moléculas seja mais alargada noutras regiões do cérebro, como no núcleo hipotalâmico ventro-médio (Balthazart *et al.*, 1991). Os núcleos que contêm células com aromatase localizam-se, quer na codorniz quer no musaranho (*Suncus murinos*), em posições adjacentes às áreas que contêm ER α , o que sugere uma acção potencialmente parácrina dos estrogénios sintetizados no cérebro a partir de androgénios

circulantes (Balthazart *et al.*, 1991, Veney, 1998 #573). Verifica-se, no entanto, uma forte co-localização das áreas imunorreactivas à aromatase com ER β , sugerindo que os estrogénios podem por um lado actuar nestas mesmas células mediando os comportamentos sexuais e/ou que a sua ligação a receptores pode estar implicada no controlo da expressão da enzima nestas regiões (Absil *et al.*, 2001a).

Experiências utilizando técnicas radiométricas permitiram não só clarificar quais as principais zonas de actuação da T no cérebro mas também compreender o papel dos androgénios na exibição dos comportamentos de cópula na codorniz japonesa (Balthazart *et al.*, 1996a; Balthazart *et al.*, 1996c; Balthazart *et al.*, 1990b; Foidart & Balthazart, 1995). Estes trabalhos, conjuntamente com experiências realizadas utilizando inibidores da aromatase e anti-estrogénios (Alexandre & Balthazart, 1986; Foidart *et al.*, 1994; Foidart *et al.*, 1995b) permitiram confirmar que os metabolitos da T (e particularmente a acumulação de E₂ em certas regiões do cérebro) têm uma relação directa com o desempenho de certos comportamentos sexuais, actuando androgénios e estrogénios em regiões diferentes do cérebro (Balthazart & Surlemont, 1990). Verificou-se também existir uma correlação entre o E₂ produzido no cérebro e o desempenho de comportamentos agonísticos e de construção de ninhos nas aves (Vockel *et al.*, 1990a), comportamentos estes que estão também directamente relacionados com a reprodução. Outra questão interessante refere-se ao facto da aromatase no cérebro dos machos de algumas aves cantoras apresentar uma distribuição no diencéfalo que varia consoante a fase da época de reprodução. Uma explicação causal para este fenómeno seria a alteração da concentração de T circulante, por sua vez associada à alteração dos comportamentos por parte dos machos (Foidart *et al.*, 1998).

Nos peixes, algumas regiões cerebrais apresentam também padrões sexualmente dimórficos, seguindo o mesmo padrão que os vertebrados superiores, mas com expressão de aromatase mais elevadas nos machos do que nas fêmeas. Os elevados níveis de aromatase nos tecidos neuroendócrinos dos peixes teleósteos torna-os de grande interesse para estudos que envolvem esta enzima, a sua regulação e o seu papel na modulação das respostas dependentes de androgénios nos tecidos neurológicos centrais (Pasmanik

& Callard, 1985). Tal como noutros vertebrados, também nos peixes existe um período sensível à exposição a esteróides produzidos pelas gónadas embrionárias. No caso de *O. mossambicus*, a sensibilidade a estrogénios ocorre nos 10 primeiros dias de vida e a androgénios entre os dias 10 e 20 (Tsai *et al.*, 2000). Tratamentos feitos com E₂ revelaram uma diminuição da expressão da aromatase e do receptor de estrogénios α (ER α) no cérebro quando aplicados até ao dia 10 pós-fertilização. O tratamento com um androgénio (17 α -metiltestosterona) entre os dias 10 e 20, pelo contrário, resultou num aumento da expressão da enzima e dos receptores de estrogénios α e β) (Tsai *et al.*, 2001).

Este conjunto de evidências permite compreender que a mediação neurofisiológica da T na activação de comportamentos sexuais depende, pelo menos em parte, da sua conversão em estrogénios. Nos machos a concentração permanente de T em circulação no plasma é em regra elevada, o que sugere que este não é o único mecanismo capaz de mediar actividades comportamentais específicas. Por outro lado, ajuda a compreender as diferenças sexuais na expressão da aromatase nos núcleos cerebrais referidos anteriormente, uma vez que a sua expressão é em parte mediada pela ligação desta hormona aos seus receptores específicos. Actualmente é também evidente que androgénios e estrogénios são importantes na mediação dos comportamentos sexuais indispensáveis à reprodução, como a cópula por parte dos machos nas aves (Balthazart & Surlémont, 1990) e os comportamentos de lordose por parte das fêmeas dos mamíferos (Bakker *et al.*, 2003), havendo no entanto autores que referem casos (por exemplo em *hamsters*) em que a produção de estrogénios não é necessária para a exibição e concretização dos comportamentos sexuais (Cooper *et al.*, 2000).

1.5.1.3 Expressão da aromatase nos diferentes tecidos

Nos ovários de grande parte dos mamíferos a produção da aromatase varia com a fase do ciclo de vida. As células da granulosa de folículos pré-ovulatórios expressam níveis mais elevados de aromatase do que folículos mais pequenos (Hickey *et al.*, 1988) e em algumas espécies como é o caso dos humanos e dos roedores, a aromatase pode também ser expressa no *corpus luteum*, variando também a quantidade da expressão com o desenvolvimento

do folículo (Hickey *et al.*, 1988). A expressão da enzima parece ser relativamente fraca quando os folículos antrais estão ainda pouco desenvolvidos, aumentando bastante na fase pré-ovulatória.

Também nos testículos dos ratos (*Rattus norvegicus*) é detectada aromatase activa (Janulis *et al.*, 1998; Carpino *et al.*, 2001; Carreau, 2001; Tsubota *et al.*, 1993). Embora as células de *Leydig* fossem inicialmente referidas como o único local de produção de estrogénios nos testículos dos mamíferos, a expressão e localização de aromatase nos testículos parece depender, pelo menos em parte, da idade. Transcritos e proteína de P450-aromatase encontram-se associados às células de *Sertoli* em animais imaturos e às células de *Leydig* nos adultos (Carreau *et al.*, 1999; Carreau, 2001), onde parece ser regulada pelo menos em parte por androgénios (Genissel & Carreau, 2001). Noutros mamíferos como o porco ou mesmo em humanos, a sua expressão está essencialmente associada às células de *Leydig* (Carreau & Levallet, 2000; Carreau, 2001). No murganho foi demonstrado que a capacidade de aromatização de androgénios a estrogénios pelas células de *Leydig* depende da idade, com valores mais elevados nos indivíduos adultos do que nos juvenis (Kmicikiewicz *et al.*, 1997) e do fotoperíodo (Kmicikiewicz & Bilinska, 1997; Bilinska *et al.*, 2001). Mais recentemente, no cavalo, a presença de células imunorreactivas de aromatase foi detectada em células de *Leydig*, assim como no citoplasma das células que se encontram a envolver as células germinais, na junção com as células de *Sertoli*, confirmando a produção local de estrogénios nestas últimas e sugerindo uma regulação parácrina da espermatogénese (Sipahutar *et al.*, 2003). Esta função reguladora parece também ser confirmada pela presença complementar das duas formas de receptores de estrogénios. A forma ER α no rato e no musaranho surge associada às células de *Leydig* (Bilinska *et al.*, 2000; Bilinska *et al.*, 2001), enquanto que a forma β do receptor é preferencialmente expressa nas células germinais (Bilinska *et al.*, 2001). Foram também detectadas isoformas não funcionais da aromatase em espermatócitos produzidas por *splicing* alternativo, que revelaram a ausência do último exão responsável pela expressão do domínio de ligação ao grupo heme, indispensável para o correcto funcionamento da enzima (Levallet *et al.*, 1998b).

Em resumo, além da presença confirmada e aceite da aromatase nos ovários, a aromatase

encontra-se também amplamente presente nas gónadas masculinas dos vertebrados, onde pode ser encontrada no citoplasma das células de *Leydig* e de *Sertoli*, nos espermatócitos (fase meiótica do paquíteno), nos diferentes tipos de espermatídeos e também nos espermatozóides propriamente ditos (revisão em O'Donnell *et al.*, 2001), tendo inclusivamente já sido confirmada a capacidade de produção de estrogénios pelos espermatozóides humanos após ejaculação (Aquila *et al.*, 2002). Esta localização generalizada da aromatase nos testículos dos vertebrados associada à expressão local de receptores de estrogénios documenta a importância que estas hormonas têm também no aparelho reprodutor masculino tendo a presença do E₂ sido confirmada como essencial para a fertilidade nos machos (revisão em Hess, 2003). Estudos feitos com murganhos *knockout* para o gene *Cyp19*, revelaram um processo de hipertrofia das células de *Leydig*, indicando que a produção local de estrogénios é fundamental para um correcto desenvolvimento das células germinais masculinas e não só para os ovários (Robertson *et al.*, 1999). A produção de estrogénios é de tal forma importante nos machos que uma desregulação dessa produção ou da sua detecção nas células alvo pode conduzir à infertilidade masculina ou a desarranjos na espermatogénese (Sharpe, 1998). Os estrogénios, ou o balanço entre estrogénios e androgénios desempenham uma função fisiológica importante na manutenção das funções das gónadas masculinas (Carreau *et al.*, 2001), mediados pela expressão da aromatase nas células de *Leydig*, nas células de *Sertoli* e também nas células germinais, sob o controlo do promotor IIa (Lanzino *et al.*, 2001).

Os padrões de expressão da aromatase na placenta variam muito durante a gestação em diferentes espécies. Os transcritos do *Cyp19* neste tecido ocorrem na nossa espécie, em primatas não humanos, em porcos, em bovinos, em cavalos e em coelhos, mas curiosamente não parece haver qualquer expressão associada à placenta dos ratos e dos murganhos, que contudo contém os factores de transcrição necessários para expressar a aromatase humana na placenta (Simpson *et al.*, 1994).

Como a produção de E₂ se encontra normalmente associada às gónadas, os restantes tecidos em que a aromatase é expressa são referidos como tecidos periféricos. Destes tecidos, o adiposo constitui uma das principais fontes de produção de estrogénios nos machos e

nas fêmeas dos vertebrados. É o tecido responsável pela conversão de grande parte da A circulante em E_3 , processo que tende a aumentar com o aumento da obesidade e com a idade em ambos os sexos (Simpson *et al.*, 1994). Este processo toma particular importância à medida que os ovários vão cessando a produção de estrogénios. O tecido adiposo é tido como importante na produção de estrogénios em mulheres na idade da menopausa e pós-menopausa, e em homens de idade mais avançada (Simpson *et al.*, 1997).

As células do osso exibem também uma grande actividade da aromatase, que desempenha um papel relevante no metabolismo do cálcio, o que associado ao facto destas constituírem um local privilegiado para o desenvolvimento de metástases do cancro da mama, tornou o osso um importante tecido alvo no estudo da expressão do *Cyp19* (Simpson *et al.*, 2000). O transcrito neste tecido revelou a presença do exão I.6 (Shozu *et al.*, 1998), embora este exão possa também ser encontrado noutros tecidos.

A aromatase foi ainda referida na pele dos humanos (Harada, 1992), onde parece utilizar o mesmo promotor que o tecido adiposo (exão I.4), que pode também estar envolvido na expressão do *Cyp19* no osso (Nelson & Bulun, 2001). A expressão da aromatase foi também detectada nos fibroblastos da pele de outros mamíferos (Longcope *et al.*, 1983) e aves (Leshin *et al.*, 1981; Schlinger *et al.*, 1989).

Em resumo, os transcritos de aromatase são expresso no SNC e em tecidos periféricos enfatizando as funções plurais dos estrogénios através da conversão local dos androgénios.

1.5.1.4 Expressão da aromatase em peixes teleósteos

À semelhança do que se conhece para mamíferos e aves, a expressão da aromatase em peixes não se restringe apenas às gónadas femininas. Em meados da década de oitenta, Pismanik e Callard (1985) investigaram a presença de aromatase em diferentes tecidos neuroendócrinos (cérebro, pituitária e espinal-medula) de duas espécies de peixes (o peixe-vermelho – *C. auratus*, e o batracoidídeo – *Opsanus tau*). Este trabalho permitiu observar valores extremamente elevados de estrogénios produzidos localmente em ambos

os sexos, comparados com os valores conhecidos para outros vertebrados (Pasmanik & Callard, 1985). Estas diferenças na expressão da aromatase no cérebro entre teleósteos e os vertebrados superiores haviam já sido referidas anteriormente (Callard *et al.*, 1978; Callard *et al.*, 1981) e pareciam sugerir que a aromatase teria, também nos peixes, um papel importante a nível do sistema nervoso central, mais particularmente em diferentes regiões do cérebro anterior, com particular incidência na área pré-óptica do hipotálamo, e na pituitária (Pasmanik & Callard, 1985).

No início da década de noventa, utilizando o peixe-vermelho como modelo, foram detectadas células neuronais imunorreactivas à aromatase utilizando anticorpos dirigidos à aromatase da placenta humana (Gelinas & Callard, 1993). Com estes anticorpos foi detectada aromatase no cérebro de *C. auratus*, assim como nos neurónios, nas células ganglionais dentro da retina, nalgumas fibras do nervo óptico e também no tracto óptico, levantando a hipótese de que os estrogénios produzidos localmente no cérebro pudessem modular a integração da informação visual relevante para a reprodução da espécie (Gelinas & Callard, 1993).

Os elevados valores de actividade da aromatase detectados no cérebro dos peixes, estiveram na origem de alguns trabalhos que tornaram evidente a existência de um transcrito específico do cérebro no peixe-vermelho (Callard & Tchoudakova, 1997; Gelinas *et al.*, 1998; Tchoudakova & Callard, 1998), transcrito este não produzido por *splicing* alternativo, mas sim originado por uma segunda cópia do gene *Cyp19*, denominado *Cyp19B*. A sequência de nucleótidos deste transcrito cerebral e a sequência de aminoácidos da proteína traduzida apresenta uma baixa homologia com sequências correspondentes do transcrito específico do ovário na mesma espécie (62%), e apresenta homologias com o gene *Cyp19A* de outras espécies de teleósteos que oscilam entre 68 e 72% (Tchoudakova & Callard, 1998). No entanto, a sua homologia nas zonas de domínios funcionais em relação a outros transcritos parece manter-se conservada (Gelinas *et al.*, 1998), produzindo uma proteína funcional. A expressão do transcrito do cérebro do peixe-vermelho apresenta alguma variação sazonal, sendo a sua actividade mais expressiva no período de desenvolvimento das gónadas com um pico no mês de Fevereiro (Gelinas *et al.*, 1998).

Inicialmente considerava-se que a presença de dois genes para a aromatase seria específico dos ciprinídeos e que o transcrito expresso no cérebro teria surgido devido a um fenómeno de tetraploidia ocorrido na sua história evolutiva. A existência de dois genes codificando cópias funcionais do gene *Cyp19* foi entretanto confirmada em várias espécies: tilápias (Cruz & Canario, 1999; Kwon *et al.*, 2001), peixe-zebra (Kishida & Callard, 2001) truta arco-íris (Dalla Valle *et al.*, 2002b), solha (Kitano *et al.*, 1999) e pargo (Gen *et al.*, 2001).

Os peixes teleósteos possuem duas cópias do gene *Cyp19*, em que uma é expressa essencialmente nas gónadas (*Cyp19A*) e a outra no cérebro (*Cyp19B*). Cada gene *Cyp19* codifica uma proteína funcional com um promotor específico e diferente região 5' a flanquear este promotor (Tchoudakova & Callard, 1998; Kishida & Callard, 2001). Adicionalmente, os genes *Cyp19A* e *Cyp19B* localizam-se em dois cromossomas diferentes no peixe-zebra e na tilápia (Chiang *et al.*, 2001b; Harvey *et al.*, 2003) e em nenhum dos casos nos cromossomas sexuais. Por esta razão, foi sugerido que embora possam influenciar o rácio sexual, estes genes não devem apresentar um papel primordial na determinação sexual na tilápia (Harvey *et al.*, 2003).

Ao contrário do que é referido para os mamíferos e para as aves, os resultados referidos para o peixe-zebra parecem não indicar a existência de diferenças entre machos e fêmeas na expressão da enzima no cérebro (Tong *et al.*, 2001a). Também no cérebro dos peixes a distribuição dos transcritos é relativamente vasta, sendo a região do hipotálamo uma das principais zonas de expressão e, conseqüentemente, a mais bem documentada. Nos peixes, a produção de estrogénios é significativa nas regiões do cérebro médio e posterior, sendo menos evidente em mamíferos e nas aves (Pasmanik & Callard, 1985). No peixe-zebra, ocorrem transcritos de *Cyp19B* no bolbo olfactivo, na região telencefálica e também no hipotálamo, quer na fase adulta quer em larvas (16 dias após a fertilização) (Tong *et al.*, 2001a). Em conjunto, estas observações parecem indicar que diferentes proteínas podem apresentar funções específicas tanto na organização cerebral das larvas em desenvolvimento, como na organização fisiológica do cérebro dos peixes e na mediação dos seus comportamentos reprodutores, à semelhança do que foi referido anteriormente para os vertebrados superiores.

1.5.2 INFLUÊNCIA DA AROMATASE

NA DETERMINAÇÃO E NA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL EM VERTEBRADOS

A diferenciação sexual resulta de uma cascata de eventos genéticos e hormonais pré determinados, que culmina na formação de testículos ou ovários, com todas as estruturas inerentes, a partir das gónadas bipotenciais. Por determinação sexual designa-se o evento que acciona todo este mecanismo (Lance, 1997). Nos vertebrados, ou pelo menos em grande parte, a determinação sexual está associada à expressão genotípica de cada indivíduo, através da existência de cromossomas sexuais. Após a determinação do sexo genético, este vai desencadear uma cascata de eventos que permitem às gónadas indiferenciadas desenvolverem-se ou como testículos no caso de se tratar de um macho, fazendo regredir as estruturas que originariam gónadas femininas, ou como ovários no caso de se tratar de uma fêmea. O processo da diferenciação sexual, bem como da organização sexual do indivíduo, depende do ambiente hormonal a que o indivíduo se encontra exposto (revisão em Becker *et al.*, 2002). Nos mamíferos, os machos em desenvolvimento necessitam de elevadas concentrações de androgénios para se diferenciarem no sentido masculino, num processo conhecido por virilização. As fêmeas desenvolvem-se na ausência da produção de androgénios, desenvolvendo ovários. Ainda nos mamíferos e mesmo nas aves, a organização sexual do cérebro é condicionada pela existência de aromatase no SNC que localmente é responsável pela conversão de androgénios aromatizáveis em estrogénios (Ball & Balthazart, 2004). A aromatase é assim um mediador central na diferenciação sexual em diferentes vertebrados e a sua importância neste processo foi já aferida experimentalmente, através da utilização de inibidores específicos em diferentes grupos de vertebrados e da subsequente aplicação de terapias de substituição.

Em muitos teleósteos, incluindo as tilápias (por exemplo, *Oreochromis niloticus* e *O. mossambicus*), a determinação sexual é definida também por um mecanismo cromossómico XX/XY (revisão em Trombka & Avtalion, 1993). Mesmo dentro do grupo das tilápias o mecanismo genético de determinação sexual não é idêntico para todo o grupo. Por exemplo, em *O. aureus* o sexo heterogamético é o feminino, e conseqüentemente, nesta espécie os cromossomas sexuais ZZ/WZ são ZZ para machos e WZ para as fêmeas (Trombka & Avtalion,

1993). O sexo genético de cada indivíduo determina o seu enquadramento hormonal, podendo ser influenciado pelo ambiente físico (temperatura) e social, e pela interação destes factores com uma componente de determinação genética (Guiguen *et al.*, 1999).

Embora as tilápias apresentem cromossomas sexuais, a temperatura tem também influência na determinação do sexo dos indivíduos, condicionando a expressão de determinados genes. Em *O. niloticus*, a temperatura de incubação influencia o *sex-ratio*, alterando a proporção de machos funcionais em cerca de 30%, a partir de fêmeas geneticamente determinadas (Baroiller *et al.*, 1995). Estes resultados foram obtidos submetendo as larvas a uma temperatura de incubação de 36°C durante o período sensível à actividade hormonal, nas duas semanas seguintes à fertilização (Baroiller *et al.*, 1995). Nesta espécie, quando a incubação é feita a temperaturas mais elevadas que as naturais a expressão do gene *Cyp19* é reprimida (D’Cotta *et al.*, 2001a), inibindo a produção de estrogénios e masculinizando os indivíduos. Também em *O. mossambicus* as temperaturas elevadas produzem descendências essencialmente masculinas, e o contrário é referido para temperaturas de incubação baixas (Wang & Tsai, 2000). As temperaturas elevadas podem, no entanto, ser também responsáveis pela estimulação de outros genes que possam estar envolvidos na diferenciação sexual destes indivíduos (D’Cotta *et al.*, 2001b). A síntese de E_2 nas gónadas é crucial para a formação dos ovários, como resultado da expressão do gene *Cyp19*, enquanto que a produção de androgénios é mediada pela enzima 11 β -hidroxilase (*Cyp11B*) que promove a diferenciação de testículos (Guiguen *et al.*, 1999).

A influência da temperatura na determinação sexual dos peixes estende-se também a outras espécies de teleósteos como é referido para alguns atherinídeos (*Odontesthes argentinensis* Strüssmann *et al.*, 1996a; *Odontesthes bonariensis* Strüssmann *et al.*, 1996b), confirmando que o efeito da temperatura, pelo menos nalgumas espécies deste grupo, parece capaz de contrariar a componente genética da determinação sexual. As baixas temperaturas de incubação induzem o desenvolvimento dos ovários, o que implica que grande parte das espécies que apresentam a temperatura como factor ambiental de determinação sexual produzirão maior número de fêmeas se a postura for incubada a uma temperatura baixa (Baroiller & D’Cotta, 2001).

Nos restantes grupos de vertebrados, nomeadamente nos répteis e nos anfíbios, embora existam espécies em que o sexo é determinado desde a fertilização por cromossomas sexuais (revisão em Pieau, 1996), os casos em que a determinação sexual é dependente da temperatura são, de facto, extremamente frequentes (Pieau *et al.*, 2001). Nestas espécies, as temperaturas de incubação influenciam o ambiente endócrino no embrião e este processo vai activar uma de duas cascatas de determinação sexual e inibir a restante, influenciando a produção predominante ou de machos ou de fêmeas (Crews & Bergeron, 1994; Crews, 1996), implicando a aromatase, através da produção de estrogénios, neste processo mediada pela temperatura (Chardard *et al.*, 1995; Jeyasuria & Place, 1998).

Estudos com inibidores da aromatase têm sido desenvolvidos com diferentes grupos (répteis anfíbios e aves) para documentar a relevância desta enzima na diferenciação sexual (Lance & Bogart, 1992; Jeyasuria & Place, 1998; Burke & Henry, 1999; Gong *et al.*, 1999; Wennstrom & Crews, 1995; Chardard & Dournon, 1999). Embora o efeito dos estrogénios seja bem aceite no que se refere à determinação sexual, o papel dos androgénios permanece controverso. Em alguns anuros, a T administrada exogenamente induz a masculinização, mas paradoxalmente nos urdelos foi já identificado o efeito contrário, promovendo a feminização de machos geneticamente determinados (Chardard *et al.*, 2003). Este resultado pode ser explicado pela aromatização dos androgénios exógenos em estrogénios, que actuarão no desenvolvimento dos ovários, o que é confirmado pela administração de androgénios não aromatizáveis que é suficiente para induzir inversão sexual em fêmeas geneticamente determinadas (Chardard *et al.*, 2003).

1.6 RECEPTORES DE ESTROGÉNIOS

Embora actualmente o papel desempenhado pelos estrogénios e pelas estruturas que são indispensáveis à sua produção e expressão seja bem conhecido no que se refere à diferenciação sexual do cérebro e à activação dos comportamentos reprodutores, na última década as suas funções foram sendo alargadas ao normal desenvolvimento dos adolescentes de ambos os sexos, ao desenvolvimento e mineralização dos ossos e mesmo

a questões relacionadas com o funcionamento do sistema circulatório (Sharpe, 1998). A completa actuação dos estrogénios nos organismos vivos inicia-se na sua produção pelo citocromo P450-aromatase, mas o seu funcionamento só fica completo quando actua nos tecidos alvo, através de ligação a receptores específicos que são os mediadores chave do efeito fisiológico dos estrogénios.

Os estrogénios podem actuar por mecanismos de acção genómica, o que constitui o modo de acção clássico. Neste processo, os estrogénios ligam-se nas células a receptores nucleares específicos. Após a ligação aos receptores, o complexo vai ligar-se a sequências particulares de DNA (elementos de resposta a estrogénios – ERE), modulando desta forma a produção de proteínas específicas. Por outro lado, os estrogénios podem actuar também de forma não genómica, exercendo a sua função por ligação a regiões membranares e que parecem ser comuns a diferentes tipos de moléculas (Nadal *et al.*, 2000). Os mecanismos de acção não genómicos podem ainda ser activados através da ligação dos estrogénios a receptores específicos presentes na membrana plasmática (Levin, 1999) e não no núcleo da célula.

Os receptores de estrogénios integram um vasto conjunto de moléculas conhecido como super família dos receptores nucleares. Esta super família constitui a maior família de factores de transcrição conhecida. A ela pertencem diferentes tipos de receptores para hormonas esteróides (T, progesterona e glucocorticóides) e que constituem a família dos receptores hormonais nucleares, ou receptores tipo I (Couse & Korach, 1999).

Na década de 80 foram clonados os primeiros receptores de estrogénios (receptor α). Foi já na segunda metade da década de 90, que foi isolada forma β do receptor codificada por um gene específico (Kuiper *et al.*, 1996; Mosselman *et al.*, 1996; Tremblay *et al.*, 1997). Não só nos mamíferos, mas também noutros grupos de vertebrados foram clonadas uma ou ambas as formas do receptor, como nas aves (Jacobs *et al.*, 1996; Lakaye *et al.*, 1998; Bernard *et al.*, 1999) e nos anfíbios (Weiler *et al.*, 1987). Nos peixes, os primeiros receptores de estrogénios foram clonados a partir de 1990 (Pakdel *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1999; Tchoudakova *et al.*, 1999; Munoz-Cueto *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2000; Pakdel *et al.*, 2000; Socorro *et al.*, 2000).

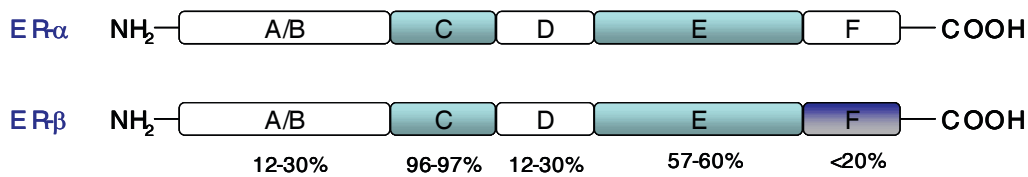


Figura 4 – Estrutura da proteína dos receptores de estrogénios nos humanos. (Adaptado de Luconi *et al.*, 2002).

A sequência de aminoácidos para os receptores nucleares encontra-se dividida em seis domínios diferentes, que foram designados de A a F (Figura 4), compreendendo cada um, uma função específica. Alguns destes domínios mantêm-se mais ou menos conservados entre indivíduos de espécies diferentes, de acordo com a função que desempenham (Figura 4). O domínio que fica mais próximo do N-terminal é conhecido como domínio A/B e apresenta um comprimento que pode ser variável e constitui ainda a região com menor taxa de homologia dentro de todos os membros da super família dos receptores nucleares. Este domínio compreende uma função de activação importante para a actividade de transcrição (Pettersson & Gustafsson, 2001). Os domínios que apresentam o maior grau de conservação da sequência entre os diferentes vertebrados são os domínios C e o E (Couse & Korach, 1999).

O Domínio C, ou domínio de ligação ao DNA é o responsável pela ligação específica ao DNA e também pelo processo de dimerização do receptor. Este domínio codifica uma estrutura composta por dois *zinc-fingers*, responsáveis pela ligação do receptor ao DNA. Estas estruturas apresentam uma homologia muito elevada, não apenas dentro dos diferentes grupos animais, como também entre as duas formas de receptores (Couse & Korach, 1999). O domínio E, que se situa quase na região C-terminal, é também designado por domínio de ligação ao ligando. Esta região, embora apenas moderadamente conservada (aproximadamente 60% entre os vários vertebrados), apresenta uma afinidade semelhante para o E₂ quer no ERα quer no ERβ.

O domínio C estabelece a sua ligação ao DNA em zonas específicas (ERE) e que são por sua vez responsáveis pela transcrição de proteínas específicas. Estes ERE apresentam

sequências com estruturas palindrômicas e que indicam que a ligação do domínio C se realiza de forma simétrica. Este processo de ligação implica a formação de dímeros de receptores, ligando-se aos ERE acoplados um ao outro, e ocupando cada um meio local de ligação na sequência palíndroma. Este processo de dimerização dos receptores é induzido pela ligação do E_2 ao receptor e que, conseqüentemente, inicia o processo de transcrição específica após ligação aos ERE. A formação de dímeros pode ser feita estando presentes dois receptores de subtipos idênticos (ex.: $ER\alpha + ER\alpha$ ou $ER\beta + ER\beta$) ou ainda utilizando subtipos diferentes ($ER\alpha + ER\beta$), formando respectivamente homodímeros ou heterodímeros, ambos funcionais (Pettersson & Gustafsson, 2001).

No Homem, os genes responsáveis pelos receptores de estrogénios são compostos por 9 exões, estando o local de início da transcrição localizado no segundo exão (Figura 5).

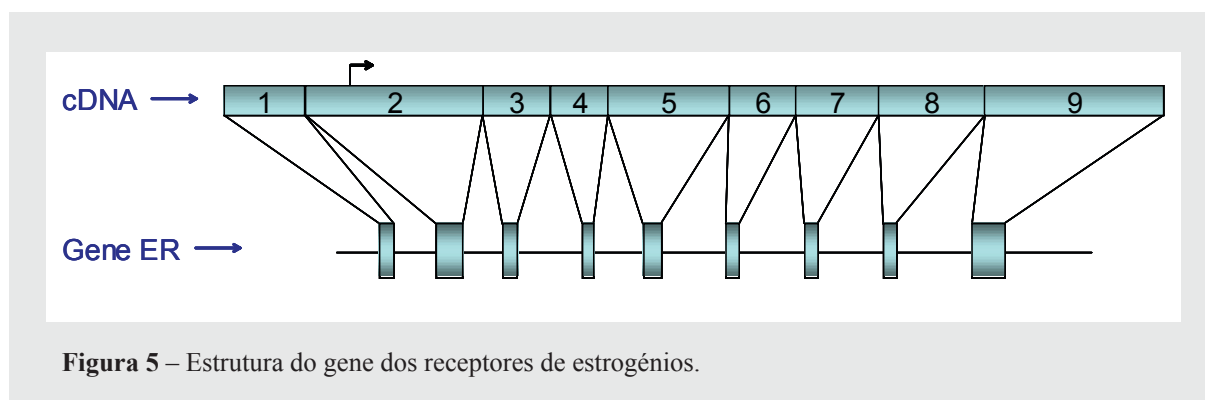


Figura 5 – Estrutura do gene dos receptores de estrogénios.

Presentemente, estão já disponíveis inúmeras sequências para ambas as formas dos receptores e, como foi referido para a aromatase, são conhecidos numerosos processos de *splicing* (revisão em Pettersson & Gustafsson, 2001; Luconi *et al.*, 2002), associados sobretudo à região C-terminal do receptor β , em que foram já descritas isoformas que parecem expressar-se preferencialmente nos tecidos neuroendócrinos, sugerindo uma regulação tecidual específica também para estas moléculas (como referida para a aromatase) (Ma *et al.*, 2000).

Recentemente, foi identificado um terceiro receptor de estrogénios em peixes. Este receptor parece ter surgido por um processo de duplicação génica a partir do receptor β (Hawkins *et al.*, 2000; Halm *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2006)

A distribuição nos diferentes tecidos dos dois principais tipos de receptores, embora com a dominância particular de uma das formas pode por vezes sobrepor-se como acontece nos tecidos reprodutores femininos (Brandenberger *et al.*, 1997; Couse *et al.*, 1997; Enmark *et al.*, 1997). A dominância de cada um dos subtipos é de alguma forma complementar tendo em conta os diferentes tecidos. O ER α é predominante no útero, glândulas mamárias, testículos, pituitária, fígado, rim, coração e músculo-esquelético. O ER β é mais significativamente expresso no ovário e na próstata (Couse & Korach, 1999).

Contudo, estes dados da expressão nem sempre são idênticos para espécies diferentes. Por exemplo, nos ovários dos mamíferos, a localização dos receptores de estrogénios não tem sempre sido referida de forma clara. Em roedores, mais particularmente no rato, a expressão da forma ER β foi referida apenas nas células da granulosa, e ER α foi apenas detectado nas células da teca (Sar & Welsch, 1999; Pelletier *et al.*, 2000). Esta separação espacial parece confirmar-se também em bovinos e em ovinos (Rosenfeld *et al.*, 1999; Cardenas *et al.*, 2001), onde a forma β do receptor foi identificada apenas nas células da granulosa, o que parece indicar a existência de uma localização complementar e separada nestes tecidos, sugerindo uma actuação específica de cada uma das formas. Em humanos, esta separação dos dois receptores em diferentes tipos celulares parece não existir (Jakimiuk *et al.*, 2002), estando ambos presentes quer nas células da teca quer na granulosa, embora este tema seja algo controverso para a nossa espécie.

Também no aparelho reprodutor masculino a presença dos receptores é essencial para um correcto funcionamento das funções reprodutoras dos machos. Embora ambas as formas estejam presentes, a presença de ER α é essencial para que se mantenha a fertilidade em murganhos (Couse *et al.*, 1997; Lindzey & Korach, 1997; Rosenfeld *et al.*, 1998). Aliás, também nas fêmeas, a manutenção da fertilidade depende da expressão conjunta dos dois receptores, α e β (Couse *et al.*, 1999), estando o receptor β implicado na normal ovulação, embora a sua ausência não impeça por si só a diferenciação sexual ou a fertilidade em ambos os sexos (Krege *et al.*, 1998).

No cérebro os receptores de estrogénios apresentam uma distribuição bastante alargada. A sua presença não constitui uma novidade, uma vez que a importância neuroendócrina

dos estrogénios é conhecida. Embora quer ER α , quer ER β tenham já a sua expressão confirmada no cérebro dos vertebrados, a expressão do ER α parece ser mais marcada do que a do ER β .

1.7 ORGANIZAÇÃO GERAL DA TESE

Esta tese está organizada em três partes:

- Na primeira foi determinado o ritmo ovulatório da tilápia em laboratório. Em paralelo, foram monitorizados os ciclos de estrogénios e progestogénios com o objectivo de se estimar o perfil hormonal em que se encontram as fêmeas, a partir do momento em que é registada uma ovulação;
- A segunda parte foi dedicada à clonagem dos RNAm das duas formas da P450-aromatase. Como a acção dos estrogénios é mediada por receptores nucleares específicos, foi também feita a clonagem de sondas específicas para dois subtipos de receptor de estrogénios (ER α e ER β). Com estas ferramentas foi determinada, por RT-PCR, a expressão dos RNAm para as quatro moléculas durante o primeiro mês de vida da tilápia. Foi ainda determinada, por *Northern blot*, a distribuição tecidual do RNAm para as formas da aromatase.
- Na terceira parte, foi feita uma análise por hibridação *in situ* da localização celular das duas formas de P450-aromatase, com o objectivo de determinar se o padrão de distribuição era idêntico em ambos os sexos.

CAPÍTULO II

CICLO OVULATÓRIO E HORMONAL NA TILÁPIA MOÇAMBICANA

2.1 INTRODUÇÃO

Os peixes teleósteos apresentam uma grande diversidade de estratégias reprodutoras. Estas estratégias são reguladas por factores internos e externos, de forma a maximizar as hipóteses de sobrevivência da descendência. Neste contexto podem distinguir-se as espécies que se reproduzem uma vez por ano, podendo produzir uma ou várias posturas (exemplos em Howell *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006), das que se reproduzem continuamente ao longo do ano (de Vlaming, 1983).

Mesmo nas espécies que se reproduzem continuamente, as variações de factores como a temperatura e o fotoperíodo podem determinar a eficiência da reprodução da espécie. Por esta razão, os reprodutores contínuos, dos quais a tilápia moçambicana é um exemplo, distribuem-se fundamentalmente em climas tropicais, uma vez que as condições abióticas são nestas regiões mais constantes. Se as condições forem óptimas para a reprodução, a emissão das posturas pode ser feita de forma continuada, apenas com a limitação imposta pelo ciclo de regeneração das gónadas (ver revisão por Coward & Bromage, 2000). As tilápias caracterizam-se ainda por fornecer cuidados parentais através da recolha dos ovos com a boca por parte de um dos progenitores (descrição comportamental para *O. mossambicus* em Oliveira, 1995). No caso da tilápia moçambicana, são as fêmeas que asseguram os cuidados com a postura após a fecundação. Se nesta situação os ovos forem retirados à progenitora, o ciclo sexual inicia-se de novo, passando a ter uma duração inferior (Smith & Haley, 1988; Coward & Bromage, 2000)

A duração do ciclo sexual foi descrita para algumas espécies de ciclídeos. Por exemplo a tilápia moçambicana tem um ciclo completo de cerca de 40 dias, incluindo incubação, ou 25 dias se não incubar (Smith & Haley, 1988; Trewavas, 1983). Adicionalmente, estes ciclídeos têm capacidade para emitir as posturas, ainda que em isolamento social (Aronson, 1949; Silverman, 1978a; Coward *et al.*, 1998) pelo que, mesmo na ausência de machos, as fêmeas completam o seu ciclo ovulatório (Trewavas, 1983).

Tal como nos vertebrados superiores, também nos peixes as hormonas esteróides (estrogénios, androgénios e progestagénios) desempenham um papel importante em

todo o processo reprodutivo. Primeiro, na organização sexual do cérebro durante o desenvolvimento ontogénico, em que a conversão central de androgénios em estrogénios pelo citocromo P450-aromatase é crucial na organização do sistema nervoso central (revisão em Becker *et al.*, 2002), mas também em todo o processo de desenvolvimento que culmina na reprodução e que passa pela diferenciação sexual, início da puberdade, desenvolvimento das células sexuais, expressão dos caracteres sexuais secundários e activação dos comportamentos sexuais (Weltzien *et al.*, 2004)

Durante o ciclo sexual feminino a acção do estradiol faz-se sentir principalmente na estimulação da produção da vitelogenina no fígado durante a vitelogénese (Smith & Thomas, 1991; Bowman *et al.*, 2000; Berg *et al.*, 2004) e pela retroacção negativa sobre a libertação da gonadotrofina da pituitária (Scott *et al.*, 1983; Weil & Marcuzzi, 1990; Montero *et al.*, 1995). Por outro lado, os progestagénios são responsáveis por desencadear a maturação final dos ovócitos (Scott *et al.*, 1998; Scott & Canario, 1990) estando implicados na activação da meiose (Zhu *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2006; Milla *et al.*, 2006), que ocorre pouco tempo antes da emissão da postura. Os principais progestagénios responsáveis por este processo são a 17,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-one (17,20 β -P) ou a 17,20 β ,21-trihidroxi-4-pregnen-3-one (17,20 β -P) (Trant *et al.*, 1986; Canario & Scott, 1989b; Nagahama, 1997; Pinter & Thomas, 1999). Ambos os esteróides estão presentes na tilápia moçambicana, mas só a 17,20 β -P aparece em níveis mais elevados na urina (Rocha & Reis-Henriques, 1996). Esta hormona também está presente em níveis elevados na urina dos machos, quer na forma livre quer conjugada a glucorónidos ou sulfatos (Oliveira *et al.*, 1996; Rocha & Reis-Henriques, 1996).

O objectivo deste estudo foi actualizar e estender as observações de Smith (1988) sobre a relação entre o ciclo de posturas e as hormonas sexuais, em especial o estradiol-17 β e a 17,20 β -P, assumindo como hipótese que os níveis destas hormonas podem ser bons indicadores do estado de desenvolvimento do ovário. O conhecimento detalhado desta relação poderá permitir uma análise mais fina do papel da aromatase no ciclo sexual e comportamento das fêmeas.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS EM CATIVEIRO

Os indivíduos de *Oreochromis mossambicus* utilizados neste trabalho foram adultos descendentes de peixes capturados durante o início da década de setenta no Rio Incomati, em Moçambique, e cedidos pelo Aquário Vasco da Gama, em Lisboa. Os peixes, de ambos os sexos, foram mantidos em tanques de armazenamento de água doce com aproximadamente 500 litros de capacidade até serem transferidos para tanques experimentais. A qualidade da água nestes tanques foi mantida através de um filtro biológico e mecânico interior, composto por uma só camada de gravilha. A temperatura foi mantida a 27°C e o fotoperíodo em condições naturais.

Os tanques experimentais tinham 200 litros de capacidade, sendo a salinidade, temperatura e fotoperíodo semelhantes às dos tanques de armazenamento. Todos os tanques funcionaram em circuito fechado, equipados com um filtro biológico de fundo, accionado por um arejador. O filtro era composto por uma primeira camada de gravilha e por uma camada superficial essencialmente composta por areia, de forma a produzir um ambiente ideal para a reprodução desta espécie. Os indivíduos foram mantidos em pequenos grupos, compostos por um macho e quatro fêmeas, de forma a simular um sistema poligínico e para evitar confrontos agonísticos entre machos pela disputa de parceiros sexuais. A alimentação foi fornecida diariamente *ad libitum* com granulado comercial.

Para as diferentes experiências deste trabalho foram utilizados um total de 8 tanques experimentais em regime de rotatividade dos grupos experimentais em função das experiências a decorrer.

2.2.2 RECOLHA DE AMOSTRAS PARA EXTRACÇÃO DOS ESTERÓIDES

As recolhas de sangue em fêmeas em incubação foram sempre efectuadas no período da manhã, entre as 8:00h e as 10:00h. Este procedimento foi utilizado porque são frequentes as variações circadianas de comportamento e dos níveis circulantes de hormonas em peixes

(Yamada *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2001c). A confirmação das alterações comportamentais circadianas foi feita através de uma experiência de controlo, em que foram colocadas 8 fêmeas em isolamento e determinadas as suas taxas de natação ao longo do dia. A experiência decorreu em 4 tanques com 60 litros de capacidade que foram mantidos com um fotoperíodo de 12h de luz, 12h de escuro e com as restantes condições mantidas como referido anteriormente. A variação das taxas de natação foi determinada filmando a actividade dos indivíduos durante 9 horas. A câmara estava colocada sobre os tanques, sendo filmadas em simultâneo 4 fêmeas em isolamento. Para a análise, foi traçada uma grelha composta por 4 quadrantes que permitiram quantificar os movimentos efectuados por cada indivíduo ao longo do tempo (Figura 6). Sempre que cada indivíduo cruzava uma das linhas da grelha, era considerado um movimento. Todos os movimentos foram registados entre as 10:00h, sensivelmente uma hora após o início do período diurno e as 19:00h.

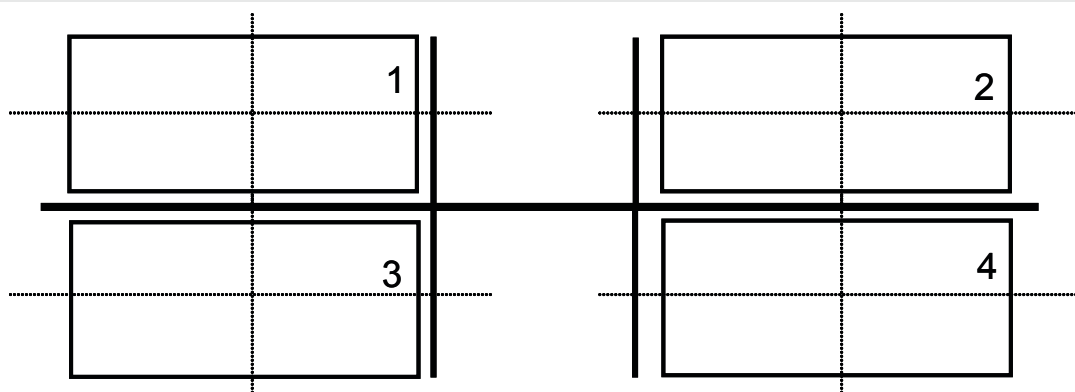


Figura 6 – Esquema representativo da experiência montada para determinação da variação das taxas de natação ao longo do dia em fêmeas de *Oreochromis mossambicus*. Neste esquema encontra-se a tracejado a grelha desenhada nos tanques para determinação da actividade de natação. Os números em cada tanque correspondem à numeração original atribuída a cada aquário.

Sempre que uma postura foi detectada na boca de uma fêmea, foi retirada sendo nessa altura considerado o início de um novo ciclo sexual. Foi dada a cada fêmea a possibilidade de realizar mais de uma postura antes da recolha das correspondentes amostras de sangue, de modo a ter conhecimento prévio do comprimento do ciclo de ovulação esperado. A frequência de recolha tomou em consideração as características individuais, especialmente

dimensões, condição física aparente e alterações significativas no hematócrito. Assim, as recolhas para um mesmo indivíduo foram na generalidade irregulares, nalguns casos não cobrindo todo o ciclo desse indivíduo ou mesmo podendo ser recolhidas amostras pontuais (Tabela 2). Em nenhuma situação foi feita uma recolha superior a 200µl de sangue para garantir a extracção de pelo menos 100µl de plasma para a extracção dos esteróides, e simultaneamente para evitar debilitar os indivíduos amostrados.

Tabela 2 – Total de amostras de sangue retiradas a cada fêmea de tilápia (n=20 indivíduos).

Indivíduo	50	66	82	94	95	96	98	99	100	101	102	103	105	106	107	108	117	121	123	302	Total de amostras
Amostras por indivíduo	2	2	3	3	4	4	3	2	1	9	3	3	7	6	1	3	4	1	1	4	66

Para a colheita de sangue, os animais foram previamente anestesiados com 2-phenoxyethanol, (0.1%, v/v; Sigma-Aldrich, Madrid), tendo o sangue sido colhido em seringas heparinizadas com 1ml a partir da veia caudal, transferido para tubos *Eppendorf* e imediatamente centrifugado a 12000rpm durante 5 minutos numa micro centrifuga. O plasma foi decantado para tubos plásticos de 1.2ml com tampa de rosca e congelados em azoto líquido onde permaneceram até armazenados numa arca congeladora a -20°C, até serem analisados.

Foram utilizados 6 aquários experimentais com famílias compostas por um macho e quatro fêmeas. Em cada família nem todas as fêmeas entraram regularmente em ovulação e periodicamente as famílias foram sendo substituídas para que nenhum animal fosse excessivamente manipulado.

2.2.3 EXTRACÇÃO DE ESTERÓIDES DO PLASMA

De cada amostra de plasma sanguíneo foram extraídos os esteróides livres e os conjugados de acordo com as metodologias descritas em Canário *et al* (1989) e Scott e Canário (1992) e resumidas na Tabela 3. Para extracção dos esteróides livres foram

adicionados 4 ml de éter dietílico para um tubo de vidro com tampa de 12 ml contendo o plasma (100 μ l), seguindo-se agitação vigorosa num agitador de vórtex durante 5 minutos. Seguiu-se centrifugação a aproximadamente 1000rpm durante 5 minutos para separar a fase orgânica da aquosa. A fase aquosa foi congelada num banho de etanol a -30°C e o éter transferido para um tubo de vidro. O processo foi repetido com nova extracção e as duas fases orgânicas foram adicionadas no mesmo tubo e de seguida evaporadas, num evaporador de vácuo (SpeedVac Plus SC1101 – SAVANT). Através da adição de hormona tritiada (10,000CPM) a um igual volume de plasma e seguindo-se o processo de extracção determinou-se que a eficiência de extracção era de 90%.

Para extracção da fracção sulfato foi efectuada hidrólise química, já que os sulfatos na posição 20 das progestinas não podem ser removidos por hidrólise enzimática utilizando as sulfatases (Sigma-Aldrich) disponíveis no mercado (Scott & Canario, 1992). A fracção aquosa remanescente da extracção inicial foi evaporada e adicionada 1 ml de uma solução de acetato de etilo (MERK)/ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich) (na proporção de 100:1 – v/v), deixando-se em incubação durante a noite a 40°C. O solvente foi evaporado num banho a 40°C com uma corrente de azoto gasoso e o resíduo dissolvido em 100 μ l de água destilada e extraído tal como indicado para a fracção livre.

Para extracção da fracção glucoronidos, os resíduos de éter dietílico da solução de água destilada foram removidos com azoto gasoso, sendo de seguida adicionados 10 μ l de suco gástrico de caracol (*Helix pomatia*), contendo 1000 unidades de β -glucoronidase (Sigma-Aldrich), em 0.5ml de tampão de acetato de sódio, pH 5.0, que foram incubados durante a noite a 37°C. Os esteróides libertados foram extraídos tal como indicado para a fracção livre.

Aos tubos que continham as diferentes fracções de esteróides livres, conjugados com sulfatos e conjugados com glucoronidos, após evaporado o éter dietílico, foi adicionado 1 ml de tampão BSA com gelatina e congelados a -20°C até serem utilizados em radioimunoensaio.

Tabela 3 – Processo de extracção das diferentes fracções de esteróides e conjugados a partir de amostras de plasma de tilápia .

EXTRACÇÃO DE ESTEROIDES A PARTIR DE AMOSTRAS DE SANGUE

- Adicionar 4ml de éter dietílico a 100µl de plasma sanguíneo.
- Agitar no vórtex 5-10min.
- Centrifugar a 900 rpm 5min.
- Ultra congelação das amostras para separar o éter da fase aquosa. O éter é transferido para um tudo de vidro e evaporado com azoto gasoso num banho a 40°C. O processo de extracção pode ser repetido até este ponto, adicionando mais 4ml de éter dietílico para aumentar a eficiência da extracção. Neste ponto estão extraídos os esteróides livres e ao tubo em que se encontram deve ser adicionado 1ml de tampão gelatina (anexo 1). As amostras são armazenadas a -20°C até utilização.
- Evaporar a fase gasosa inicial que restou da extracção anterior com azoto gasoso num banho a 40°C.
- Adicionar 1ml da solução 1:100 de TFA (ácido Trifluoroacético) em acetato de etilo. Este passo promove a quebra das ligações entre os esteroides e os grupos sulfatos.
- Incubar a 40°C durante a noite.
- Manter as amostras a 40°C e evaporar com azoto gasoso.
- Adicionar 500µl tampão acetato (anexo 1) para separar os esteroides dos sulfatos libertados.
- Extrair a fracção conjugada com sulfatos adicionando 4ml de éter dietílico.
- O processo de agitação, centrifugação e separação das fases aquosa e orgânica devem decorrer como descrito previamente. O processo de extracção deve ser repetido adicionando mais 4ml de éter dietílico para aumentar a eficiência da extracção. Após recuperada a fase orgânica e evaporada com azoto gasoso a 40°C, às amostras deve ser adicionado 1 ml de tampão gelatina e armazenadas a -20°C. Neste ponto estão extraídos os esteróides conjugados com sulfatos.
- À fracção aquosa remanescente, adicionar 10µl de β-glucuronidase e incubar a 37°C durante a noite.
- Extrair a fracção conjugada com glucorónidos adicionando 4ml de éter dietílico.
- O processo de agitação, centrifugação e separação das fases aquosa e orgânica devem decorrer como descrito previamente para a extracção dos esteroides livres. O processo de extracção deve ser repetido adicionando mais 4ml de éter dietílico para aumentar a eficiência da extracção. Após recuperada a fase orgânica e evaporada com azoto gasoso a 40°C, às amostras deve ser adicionado 1 ml de tampão gelatina e armazenadas a -20°C. Neste ponto estão extraídos os esteróides conjugados com glucorónidos e terminado o processo de extracção.

2.2.4 RADIOIMUNOENSAIOS

A metodologia utilizada nos radioimunoensaios foi no essencial a descrita por Scott *et al.* (1982) e Canário *et al.* (1989). O radioimunoensaio de $17,20\beta$ -P foi caracterizado por Canário *et al.* (1989), tinha como limite de detecção 100pg/ml e a variação intra-ensaio e inter-ensaio eram respectivamente de 4.6 e 15.5%. O antisoro de estradiol- 17β foi adquirido a *Research Diagnostics* (Concord, MA, EUA) e o radioimunoensaio foi caracterizado por Condeça e Canário (1999). Tinha como limite de detecção 200pg/ml e a variação intra-ensaio e inter-ensaio eram respectivamente de 9.1 e 9.2%. Os marcadores tritiados, estradiol- 17β e 17-hidroxiprogesterona (17-P) foram adquiridos a Amersham (Reino Unido). A $17,20\beta$ -P foi convertida enzimaticamente a partir de 17-P usando a metodologia descrita por Scott *et al.* (1982). A radioactividade de cada tubo de radioimunoensaio foi quantificada num contador de cintilações beta (Beckman LS 6000 Series Liquid Scintillation System) após adição de líquido de cintilação (Optiphase “Hisafe” WALLAC).

2.2.5 TRATAMENTO DOS DADOS

A duração do ciclo sexual da tilápia é bastante variável de indivíduo para indivíduo. Tomando em consideração estas variações, os dias de ciclo em que foram recolhidas amostras foram ponderados relativamente ao total de dias do ciclo. A fase do ciclo em que cada fêmea se encontrava foi calculada, dividindo o dia do ciclo em que a amostra foi recolhida pelo número total de dias do ciclo reprodutivo dessa fêmea. Desta forma, cada valor utilizado pode variar continuamente entre 0 e 1. Foram utilizadas como válidas todas as fêmeas que emitiram posturas com intervalos compreendidos entre 14 e 34 dias.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 DURAÇÃO DO CICLO SEXUAL FEMININO DA TILÁPIA

A Tabela 2 condensa a informação de todas as amostras de sangue recolhidas no âmbito desta

experiência. De entre as 20 fêmeas utilizadas nem todas ovularam regularmente. Algumas fêmeas emitiram posturas em intervalos regulares, enquanto outras apresentaram uma grande variação no intervalo entre posturas (IEP). Por esta razão, foi desenvolvida uma outra experiência com o objectivo de compreender qual o padrão inerente à emissão das posturas. Para esta experiência foram também utilizadas 20 fêmeas, embora nem todas elas sejam coincidentes com as referidas anteriormente e decorreu por um período de 12 meses.

Tabela 4 – Distribuição por tanque e por fêmea da regularidade das posturas. Nesta tabela são apresentados, a título de exemplo, os valores e os desvios padrão da duração do ciclo de algumas das fêmeas que foram observadas regularmente. Com excepção do tanque 4, todos os restantes tanques apenas apresentam uma fêmea que emite posturas de forma regular. Com emissão regular de posturas, foram consideradas todas as fêmeas que em média emitiram posturas com valores de IEP inferiores a 34 dias.

Tanque	Número da fêmea	Emissão das posturas	Nº posturas	Valor médio (dias)	Desvio padrão (dias)
1	105	Regular	16	18,8	8,3
1	114	Não emite	—	—	—
1	116	Não emite	—	—	—
1	117	Irregular	6	56,8	42,3
2	106	Regular	11	28,5	14,3
2	111	Não emite	—	—	—
2	112	Irregular	5	51	52,9
2	113	Não emite	—	—	—
3	101	Regular	12	18,7	3,1
3	103	Não emite	—	—	—
3	104	Não emite	—	—	—
3	108	Não emite	—	—	—
4	118	Irregular	6	43,8	53,6
4	121	Regular	9	25,6	19,5
4	123	Regular	12	27,1	17,4
4	330	Não emite	—	—	—
5	301	Irregular	2	88	—
5	302	Regular	4	19,3	7,5
5	328	Não emite	—	—	—
5	329	Não emite	—	—	—

A Tabela 4 sumaria a informação referente ao número de posturas recolhidas neste conjunto de indivíduos e da sua distribuição nos 5 tanques experimentais. Das 20 fêmeas observadas foi possível verificar que apenas 10 emitiram posturas e destas só 6 o fizeram de forma regular (em intervalos médios inferiores a 34 dias). De uma forma geral e com

excepção para apenas um dos tanques, apenas uma fêmea por tanque se reproduz de forma regular ao longo do período de observação. Existem ainda alguns tanques em que outras fêmeas entram pontualmente e irregularmente em ovulação e fêmeas que nunca emitiram posturas ao longo de todo o período de acompanhamento.

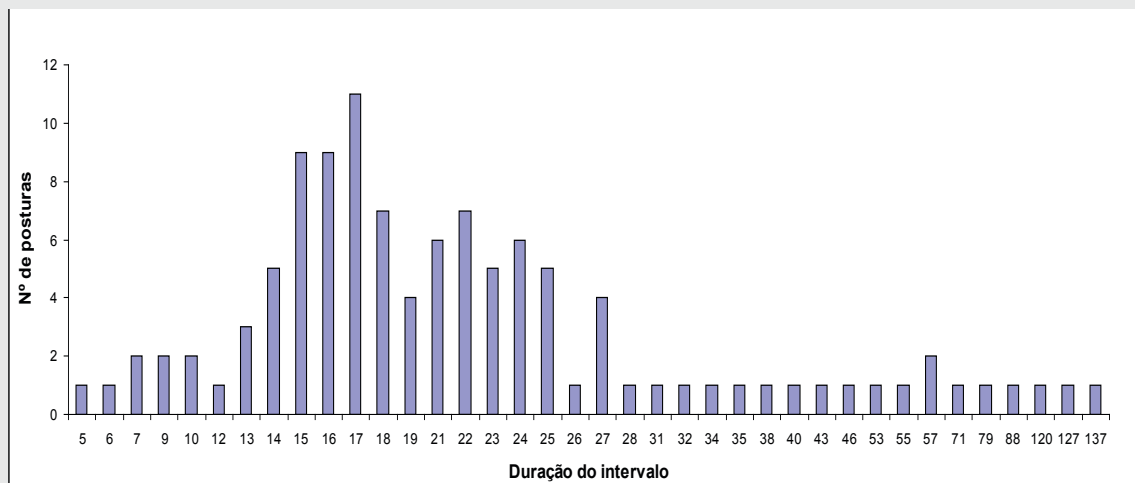


Figura 7 – Variação do intervalo entre posturas para diferentes fêmeas. Note-se que uma mesma fêmea, embora tenda a ser regular na forma como emite as suas posturas, pode apresentar intervalos variáveis de um ciclo para o seguinte.

A IEP apresentou uma grande variabilidade, entre 5 e 137 dias, sendo que os valores mais extremos revelam uma frequência baixa (Figura 7). No entanto, a moda de IEP foi de 17 dias. Com base nestes valores, e tendo em conta que outros autores referem que ciclos interrompidos para esta espécie duram aproximadamente entre 15 a 25 dias (Smith & Haley, 1988; Coward & Bromage, 2000), considerámos para os estudos hormonais os dados obtido a partir de fêmeas que ovulavam com intervalos regulares que variavam entre 14 e 34 dias.

Após a definição do IEP, foi determinado qual o período de maior actividade comportamental, para o que foram quantificadas as actividades natatórias de 8 fêmeas. As observações comportamentais revelaram não haver uma grande variação ao longo das primeiras horas de luz.

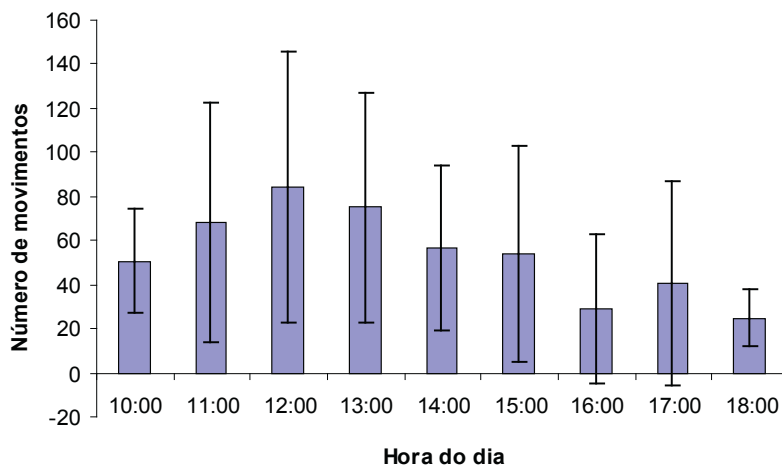


Figura 8 – Ritmos de actividade das fêmeas ao longo do dia. Estes ritmos foram determinados pelos valores médios da taxa de natação das 8 fêmeas utilizadas. Considerou-se um movimento sempre que cada fêmea cruzava uma das linhas definidas no aquário (ver Figura 6).

Pelo contrário, após as 12 horas há um declínio progressivo da taxa de natação das fêmeas (Figura 8). Por esta razão, optou-se por estabelecer os períodos de amostragem sistematicamente nas primeiras horas da manhã, para que os valores obtidos não fossem afectados por possíveis variações circadianas nos perfis hormonais desta espécie.

2.3.2 VARIAÇÃO HORMONAL DURANTE O CICLO SEXUAL DA TILÁPIA

A análise dos perfis hormonais foi feita para duas hormonas: o estradiol e a $17,20\beta$ -P. Foram quantificados os níveis das diferentes fracções para cada esteróide. Foi ainda feita a distinção entre as amostras recolhidas de fêmeas com ciclos regulares, com intervalos compreendidos entre os 14 e os 34 dias e de fêmeas que apresentaram ciclos superiores a 34 dias. Esta distinção teve como objectivo compreender se, independentemente da duração do ciclo, o perfil hormonal se mantém idêntico.

2.3.2.1 Estradiol-17 β

A fracção maioritária do estradiol-17 β plasmático nas fêmeas que emitiram posturas regulares encontrava-se na forma livre, sendo esta forma que parece variar ao longo do ciclo (Figura 9). Os valores das fracções sulfato e glucorónido mantêm-se aproximadamente constantes ao longo de todo o ciclo, variando entre o limite de detectabilidade do teste e valores que, apenas em situações pontuais, rondam as 6ng/ml.

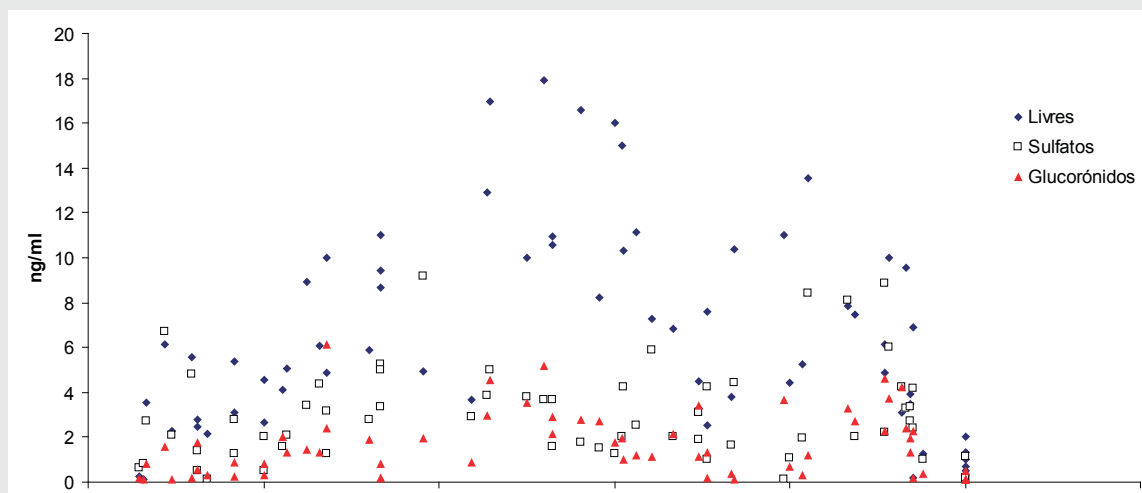


Figura 9 – Concentração das diferentes fracções (livres ◆, sulfatos □ e glucorónidos ▲) para o estradiol-17 β ao longo do ciclo sexual feminino. Os dados foram obtidos a partir de 20 fêmeas com intervalos entre posturas compreendidos entre 14 e 34 dias.

As concentrações de estradiol-17 β livre aumentaram constantemente até meio do ciclo, mantendo-se depois relativamente elevado até antes da ovulação. Pouco antes desta fase parece haver um segundo pico relativo (Figura 9).

O gráfico do estradiol-17 β total, resultantes da soma das três fracções (Figura 10), permitem ter uma noção mais clara do valor do padrão hormonal onde se realçam os dois máximos relativos e a manutenção de valores elevados até próximo da fase final do ciclo.

Os valores do estradiol circulante no plasma para IEP irregulares encontram-se expressos na Figura 11. Quer observando nesta figura os valores das diferentes fracções, quer observando os valores totais expressos na Figura 12, não parece existir o padrão detectado na Figura 9 e na Figura 10 para a distribuição dos valores desta hormona.

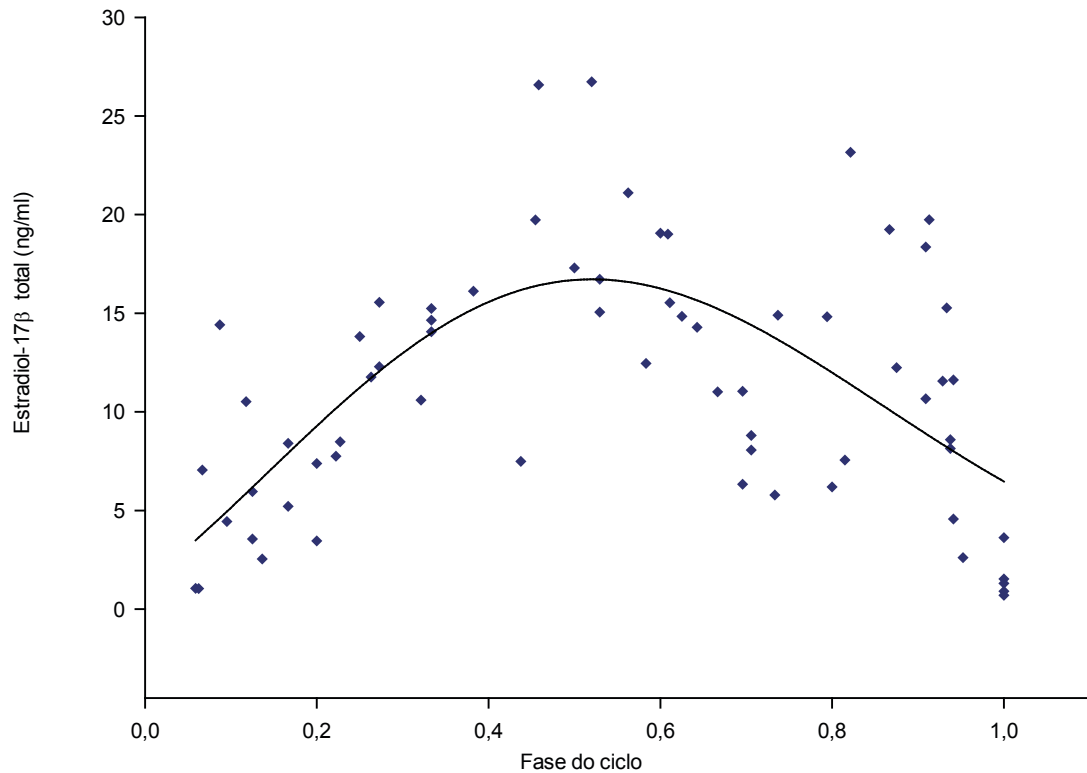


Figura 10 – Concentração de estradiol-17 β total no ciclo sexual feminino da tilápia. O gráfico resulta da adição das 3 fracções representados na Figura 9. Os dados foram obtidos a partir de 20 fêmeas com intervalos entre posturas compreendidos entre 14 e 34 dias. A linha de tendência resulta da aplicação de um modelo de regressão não linear polinomial de terceira ordem ($Y(\text{ng/ml})=0.3599+54.5X-42.42X^2-7.39X^3$) em que X é a fase do ciclo. O coeficiente de determinação $R^2=0.419$ (ajustado à média das observações= 0.391) para $n=66$.

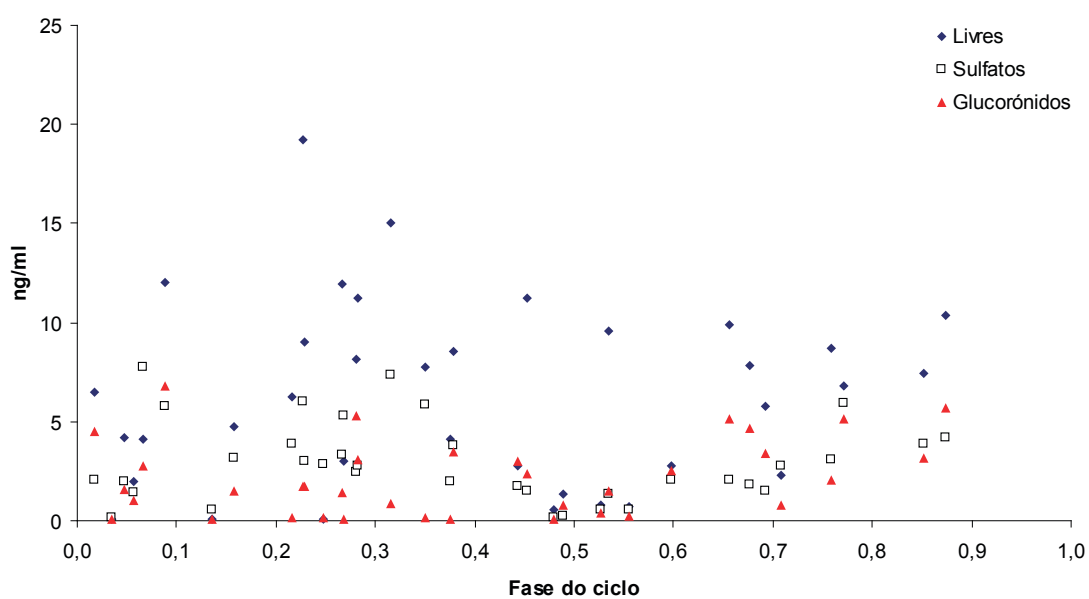


Figura 11 – Concentração das diferentes fracções (livres ◆, sulfatos □ e glucorónidos ▲) para o estradiol-17 β em fêmeas com intervalos entre posturas superiores a 34 dias.

Embora por vezes os valores sejam bastante elevados, estes encontram-se essencialmente na primeira fase do ciclo, parecendo descer ligeiramente até à fase final. A excepção parece ser a parte inicial do ciclo até 0,3, estabilizando depois em valores baixos.

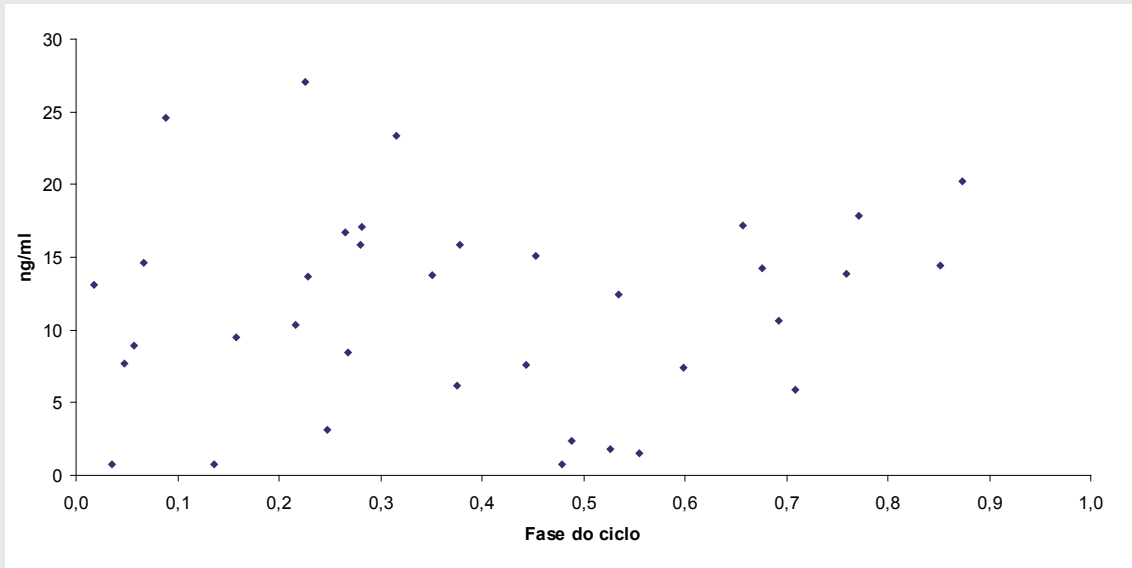


Figura 12 – Concentração plasmática de estradiol-17 β total em fêmeas com intervalos entre posturas superiores a 34 dias.

2.3.2.2 17 α ,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona

Os níveis plasmáticos de 17,20 β -P para cada uma das fracções eram na generalidade baixos ou não detectáveis, com excepções mais frequentes e valores médios mais elevados na segunda fase do ciclo (Figura 13). Quando considerado o somatório das três fracções resulta um padrão mais nítido (Figura 14) em que os níveis de 17,20 β -P se mantêm regularmente baixos, variando entre o limite de detecção e os 4ng/ml, normalmente inferiores a 2ng/ml, mas com alguns indivíduos a apresentar na fase final do ciclo valores superiores, até 9ng/ml.

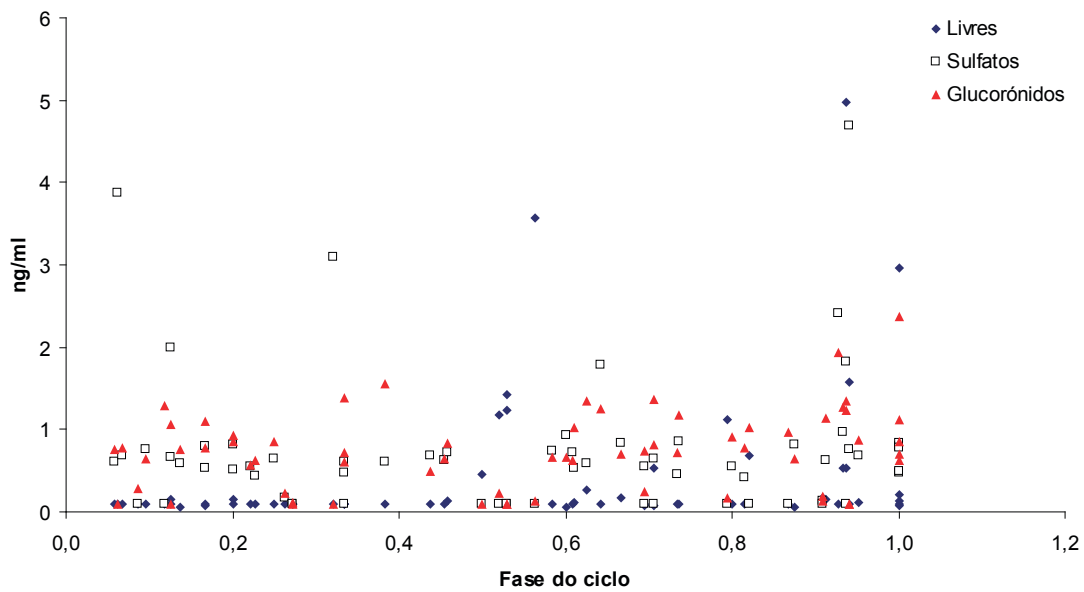


Figura 13 – Concentração de 17,20β-P e seus conjugados (livres ♦, sulfatos □ e glucoronidos ▲) ao longo do ciclo sexual feminino da tilápia em fêmeas com ciclos regulares compreendidos entre 14 e 34 dias.

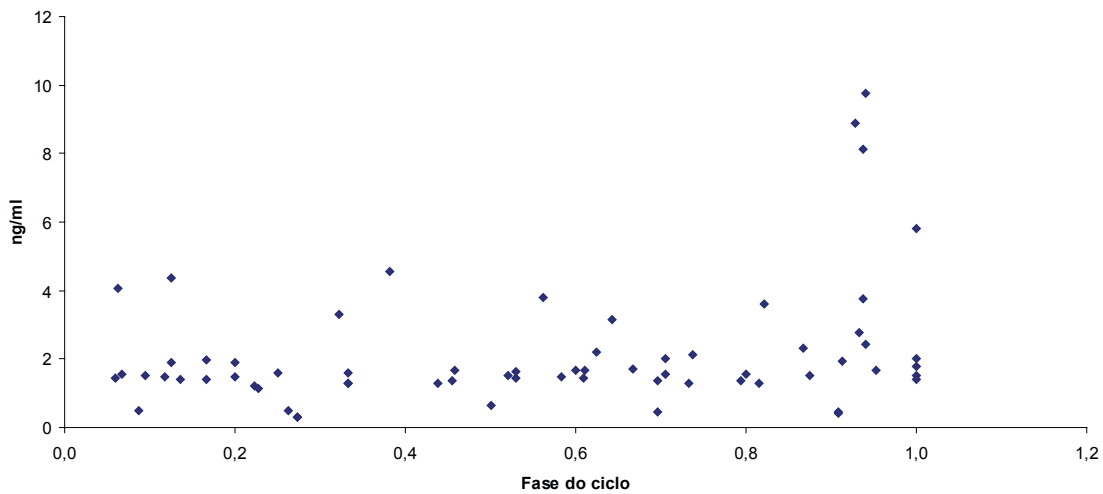


Figura 14 – Concentração de 17,20β-P total em fêmeas de *O. mossambicus*, durante o seu ciclo sexual.

O perfil da 17,20β-P ao longo dos ciclos que se estenderam por mais de 34 dias não apresenta o padrão descrito para as fêmeas mais regulares. Por um lado existe um maior número de amostras em que a hormona é indetectável, e, por outro lado, valores ocasionais relativamente elevados ocorrem no início e meio do ciclo nas diferentes fracções (Figura 15) e nos valores totais (Figura 16).

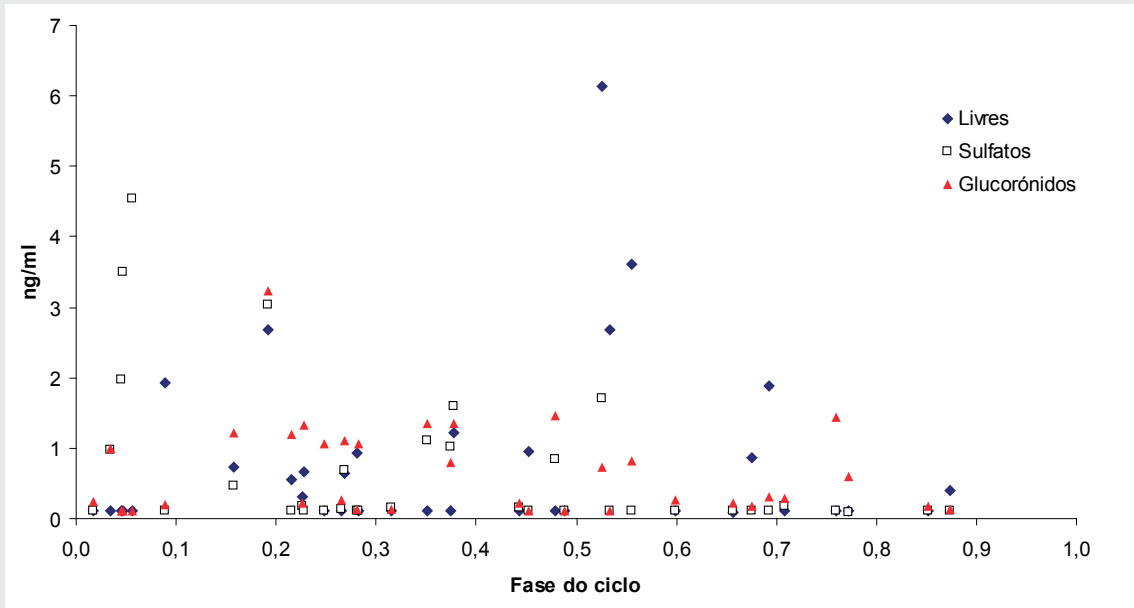


Figura 15 – Concentração plasmática das frações livres e conjugadas (livres \blacklozenge , sulfatos \square e glucorónidos \blacktriangle) de 17,20 β -P ao longo do ciclo sexual das fêmeas com intervalos entre posturas superiores a 34 dias.

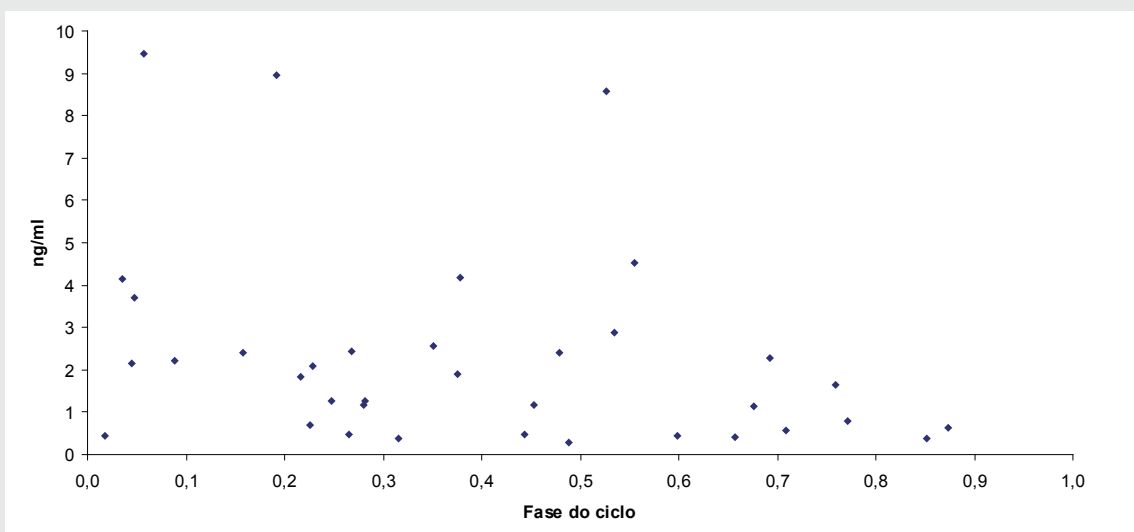


Figura 16 – Concentração plasmática de 17,20 β -P total ao longo do ciclo sexual das fêmeas com intervalos entre posturas superiores a 34 dias.

2.4 DISCUSSÃO

Este trabalho permitiu estabelecer a duração dos ciclos ovulatórios da tilápia moçambicana nas condições de laboratório por nós utilizadas, e associar as alterações das principais hormonas sexuais a cada ponto do ciclo. Um dos principais aspectos evidenciados foi a disparidade da duração do IEP (5 – 137), embora cada fêmea seja relativamente regular e não seja ainda clara qual a origem das diferenças inter individuais. Enquanto que a temperatura, fotoperíodo, remoção de ovos da incubação bucal, rácio sexual, alimentação e stress de confinamento podem influenciar a duração do ciclo na globalidade (Coward & Bromage, 2000), é provável que factores sociais possam estar na origem destas diferenças. Por exemplo, já foi demonstrado que as fêmeas de tilápia moçambicana podem reproduzir-se mesmo quando isoladas, mas possuem ciclos mais longos do que fêmeas não isoladas (Marshall, 1972; Silverman, 1978a; Silverman, 1978b). Além disso, o estímulo visual de outras fêmeas presentes acelera a ovulação, mas a vitelogénese está dependente de estímulos químicos ou tácteis (Silverman, 1978a; Silverman, 1978b). Dado que na nossa experiência os grupos eram composto por 4 fêmeas e um macho, estavam aparentemente reunidas as condições para a formação de ciclos de postura regulares. No entanto, foi possível verificar que em cada grupo apenas uma das 4 fêmeas entravam em ovulação de forma regular. Esta observação permite-nos especular que possivelmente existe um mecanismo social capaz de condicionar a emissão das posturas num grupo de fêmeas, e que este mecanismo pode estar inerente, por exemplo, ao estatuto de dominância das fêmeas dentro do grupo. Desde que existissem no mesmo tanque fêmeas reprodutoras dominantes, as fêmeas subordinadas apresentaram ciclos sexuais mais espaçados ou revelaram mesmo incapacidade de se reproduzir. Mais ainda, as fêmeas subordinadas produziram de forma geral posturas inviáveis, o que parece indicar que embora possam entrar em ovulação (no caso das fêmeas que ovulam de forma irregular), muito provavelmente as suas posturas nunca chegaram a ser fecundadas. Por outro lado, fêmeas subordinadas quando colocadas apenas com machos parentais, rapidamente desenvolviam capacidade ovulatória e apresentavam emissões de posturas viáveis (dados não apresentados), o que é possível exactamente pela assincronia do desenvolvimento dos seus ovários, que apresentam

ovócitos em diferentes estádios de desenvolvimento. Embora necessite de confirmação, através do estabelecimento das hierarquias de um grupo, a par dos resultados da emissão das posturas, o facto de possivelmente só as fêmeas hierarquicamente superiores fazerem posturas regulares sugere a existência de um mecanismo que inibe o eixo reprodutor relacionado com constrangimentos sociais. Mesmo com uma variação ampla a maior parte das posturas ocorreram entre 14 e os 27 dias, com uma moda aos 17 dias, valor um pouco mais curto do que o referido por outros autores (ver revisão por Coward & Bromage, 2000). As razões para estas diferenças não são claras, mas um ou vários dos factores acima indicados podem ser responsáveis.

O desenvolvimento das gónadas femininas está directamente relacionado com os ciclos das hormonas esteróides por elas produzidas e que respondem a um complexo mecanismo de *feedbacks* positivo e negativo a partir do hipotálamo e das gonadotrofinas produzidas pela hipófise (Patino & Thomas, 1990). A produção de estradiol por parte dos ovários despoleta a produção de vitelogenina hepática que é capturada pelos ovócitos em desenvolvimento, e transformada em lipovitelina e fosvitina (Sawaguchi *et al.*, 2006), duas das maiores proteínas que formam os ovócitos. Por outro lado, o aumento da produção de vitelogenina exerce nos ovários um processo de *feedback* negativo, diminuindo a produção de estradiol nos ovócitos (Reis-Henriques *et al.*, 2000), o que resulta na conseqüente paragem na produção de vitelogenina hepática. Este processo é fundamental para o correcto desenvolvimento dos ovócitos e parece ser transversal em todos os tipos de peixes. A regulação da vitelogénese por parte do estradiol ocorre em peixes com as mais diversas estratégias de reprodução, sejam eles reprodutores contínuos como as tilápias (Rocha & Reis-Henriques, 1996), sejam reprodutores anuais (Pavlidis *et al.*, 2000; Pinillos *et al.*, 2003), e mesmo em espécies hermafroditas (exemplo em Li *et al.*, 2006).

Neste estudo, a variação das concentrações de estradiol parece seguir o padrão normal no processo de maturação do ovário, com um pico na fase mediana do ciclo. Esta distribuição é relativamente consistente nas 3 fracções analisadas, embora sejam os valores de esteróides livres que mais contribuem para o perfil total desta hormona. Nas fêmeas com IEP compreendidos entre 14 e 34 dias, existe uma subida gradual dos valores do estradiol

até sensivelmente meio do ciclo, após o que existe uma quebra, para que os valores voltem a subir de novo imediatamente antes da postura. A subida mais significativa é coincidente com dados fornecidos por outros autores para outras espécies (exemplo em Barnett & Pankhurst, 1994), e deverá corresponder ao aumento de vitelogénese. A subida dos valores do estradiol deverá ser responsável pela produção de vitelogenina hepática que, conseqüentemente, estimula a produção de vitelo indispensável ao crescimento do ovo, o que se considerarmos um ciclo médio com 26 dias corresponde aproximadamente ao 13º dia após a emissão da postura anterior. Este perfil é semelhante ao já descrito para esta espécie (Smith & Haley, 1988). A variação do estradiol nos ciclos hormonais com mais de 34 dias de duração revelou valores atípicos comparativamente com os ciclos compreendidos entre 14 e 34 dias (Figura 11 e Figura 12), não evidenciando o padrão detectado na Figura 10. A diferença verificada entre os dois tipos de ciclos parece indicar que as fêmeas que emitem posturas com intervalos muito prolongados, além de entrarem em ovulações de forma irregular, produzem ovos que eventualmente não terão a mesma qualidade que os produzidos de forma regular em que o perfil hormonal corresponde ao descrito anteriormente, por não terem sofrido um processo de vitelogénese correcto.

Os progestogénios são hormonas ligadas à reprodução em todos os vertebrados. Nos mamíferos são responsáveis pela preparação do tracto reprodutivo para a gestação assim como na preparação eixo cérebro – pituitária para a reprodução, em conjunto com o estradiol (Becker *et al.*, 2002; Atteke *et al.*, 2003). Nos vertebrados inferiores desempenham funções importantes também na maturação das células sexuais. Nas fêmeas, estas hormonas estão envolvidas na maturação final dos ovócitos, induzindo a meiose e a ovulação por mecanismos genómicos e não genómicos (Thomas *et al.*, 2006).

A 17,20β-P apresenta valores relativamente baixos nas diferentes fracções durante todo o ciclo com excepção da sua fase final (Figura 13). Embora o padrão não seja claro, parece existir uma tendência para que os valores mais elevados se concentrem imediatamente antes da emissão da postura. Este padrão torna-se particularmente claro quando observados os valores totais para esta hormona (Figura 14). Ao contrário do verificado para o estradiol em que os valores totais detectados eram maioritariamente assegurados pela fracção livre,

na 17,20 β -P os valores elevados na fase final do ciclo são originados não só pela fracção livre, mas também pelos sulfatos e pelos glucoronídeos. A repentina subida dos valores totais na fase final do ciclo pode indicar a 17,20 β -P como um potencial candidato a hormona da maturação final dos ovócitos nesta espécie, como foi já referido para diferentes espécies de teleósteos (ver Tabela 1, secção 1.2.1). No entanto algumas das fracções isoladas revelam valores mais elevados ao longo do ciclo sem contudo excederem os 4ng/ml. Após analisado os ritmos de actividade das fêmeas ao longo do dia, optou-se por fazer as recolhas do material biológico sistematicamente no período da manhã, por este ser o período de maior actividade. No entanto, este procedimento pode ter influenciado os resultados e explicar parcialmente os baixos níveis de 17,20 β -P encontrados, uma vez que se trata de uma hormona de maturação dos ovócitos, processo que tende a decorrer no final da tarde, com já foi descrito para o peixe vermelho (*C. auratus*) (Kobayashi *et al.*, 1988). Este ponto poderá ser clarificado no futuro, alterando a hora de recolha das amostras e tentando compreender os padrões circadianos de variação deste esteróide.

Em peixes assíncronos como no peixe vermelho a concentração dos esteróides maturadores finais dos ovócitos (MIS) são significativamente mais baixas (<5 ng/ml) (Kobayashi *et al.*, 1987) do que em espécies síncronas (truta arco-íris) em que os valores são bastante mais elevados (superiores a 100 ng/ml, podendo atingir 800 ng/ml) (Scott *et al.*, 1983). Na tilápia moçambicana, os valores por nós obtidos mesmo na fase de maturação final rondam os 9 – 10 ng/ml, por isso muito próximos dos registados para o peixe vermelho (Kobayashi *et al.*, 1987) e para *O. aureos* (entre 1-10 ng/ml) (Yaron *et al.*, 1983) do que para a truta. Note-se que em espécies assíncronas (exemplos em Rinchard *et al.*, 1993), como acontece na tilápia, a quantidade de folículos que produzem esteróides responsáveis pela maturação final são muito poucos, o que pode também justificar uma tão baixa concentração de 17,20 β -P nas amostras aqui apresentadas. Para *O. mossambicus*, embora a caracterização do ciclo dos esteróides indutores finais da maturação não esteja determinada, Rocha e Reis-Henriques (Rocha & Reis-Henriques, 1996) induziram a maturação final através da administração de HCG, não tendo detectado uma alteração significativa nos valores da 17,20 β -P em relação ao controlo, que se situaram entre 1-7 ng/ml. Por outro lado, os

mesmos autores, após a indução da maturação, detectaram um acentuado incremento de outro esteróide já indicado como putativo indutor final da maturação (3,17,21-P5b) em relação aos valores do grupo controlo. Esta questão, juntamente com os dados apresentados neste trabalho, parece indicar que a 17,20b-P poderá não funcionar como maturador final nesta espécie. Por outro lado, foi já determinado que *O. mossambicus* é incapaz de detectar pelo olfacto este esteróide (Frade *et al.*, 2002). Desta forma, permanece pouco clara qual a função principal da 17,20b-P nesta espécie, quer nas fêmeas quer nos machos, que apresentam níveis extremamente elevados de 17,20b-P na urina quando na presença de fêmeas ovuladas (dados não apresentados). No entanto, como este esteróide foi já implicado na aquisição de mobilidade do esperma, esta poderá ser a razão pela qual os machos em presença de fêmeas ovuladas produzirão tão elevadas concentrações desta hormona, como preparação para a reprodução. Os níveis tão elevados de 17,20b-P na urina podem assim ser explicados como produtos de excreção.

Embora a 17,20 β -P seja um dos esteróides responsáveis pela maturação final dos ovócitos em diferentes espécies de peixes, esta hormona não tem as suas funções completamente clarificadas. Por exemplo na *Tinca tinca*, as concentrações elevadas deste esteróide não estão apenas associadas à fase de pré-postura (Pinillos *et al.*, 2003), o que sugere que o seu papel como maturador final dos ovócitos pareça improvável.

Em conclusão, a tilápia moçambicana apresenta, para as condições experimentais por nós praticadas, ciclos reprodutores que variam entre de forma regular entre 14 e 34 dias para ciclos interrompidos, com um valor modal de 17 dias. A variação dos valores do estradiol parece seguir o padrão normal em teleósteos, com um pico a meio do ciclo que deverá ser responsável pela vitelogénese e conseqüente desenvolvimento dos ovócitos. O putativo MIS que tentámos identificar neste estudo, revelou valores sistematicamente baixos ao longo de todo o ciclo, com um ligeiro incremento na fase final. Os baixos valores verificados para a 17,20 β -P podem estar relacionados com a assincronia da emissão das posturas nesta espécie, que implica a existência de poucos folículos a produzirem a hormona em questão, ou ainda com a rotina das amostragens uma vez que estas foram feitas de forma sistemática no período da manhã, o que poderá ter influenciado os resultados.

CAPÍTULO III

CLONAGEM E EXPRESSÃO ONTOGÉNICA DO CITOCROMO P450-AROMATASE E DOS RECEPTORES DE ESTROGÉNIOS

3.1 INTRODUÇÃO

Nos vertebrados, o citocromo P450-aromatase (P450arom) ou estrogénio sintase, uma enzima codificada pelo gene *Cyp19*, é responsável pela conversão dos androgénios (C_{19}) em estrogénios (C_{18}). A enzima desempenha papéis fundamentais no ovário e no cérebro, onde se apresenta activamente envolvida no controlo da reprodução (Balthazart, 1993; Kah *et al.*, 1993), na diferenciação sexual do cérebro (Aste *et al.*, 1993; Balthazart *et al.*, 1998; Roselli *et al.*, 1998a) e na activação dos comportamentos sexuais masculinos (Roselli *et al.*, 1998a; Balthazart, 1997; Schumacher & Balthazart, 1987; Panzica *et al.*, 1996).

Embora tenha inicialmente sido encontrada nos ovários e na placenta, os transcritos da P450arom podem ser encontrados numa grande variedade de tecidos como a pele, tecido adiposo, e sistema nervoso central (Gelinas *et al.*, 1998; Furbass *et al.*, 1997; Balthazart, 1993). Nos mamíferos, essencialmente em humanos, foram já descritos para os genes de P450-aromatase, diferentes promotores específicos para cada tecido, estando estes promotores associados ao primeiro exão não traduzido do gene da aromatase (Mahendroo *et al.*, 1991). Estes promotores são responsáveis pela coordenação na regulação específica da transcrição da aromatase nos diferentes tecidos. No peixe-vermelho, *Carassius auratus*, os elevados níveis de actividade da P450arom levaram ao isolamento de um cDNA específico, (P450arom cérebro) com apenas 56% de homologia em relação a outro cDNA isolado a partir do ovário (P450arom ovário) (Gelinas *et al.*, 1998). Desde então as duas formas da enzima têm sido clonadas em várias espécies de peixe (ex. Chang *et al.*, 1997; Chiang *et al.*, 2001a; Dalla Valle *et al.*, 2002a). Na tilápia moçambicana, *Oreochromis mossambicus* foram detectados elevados níveis de actividade desta enzima no cérebro de machos, com um grau de magnitude duas vezes superior ao das fêmeas, actividade essencialmente produzida nas regiões do tálamo e do telencéfalo, (Oliveira & Canario, *in press*). Esta observação levantou a hipótese de que as duas formas P450arom possam estar presentes na tilápia moçambicana desempenhando funções específicas relacionadas com o comportamento sexual (P450arom cérebro) e com a diferenciação das gónadas e com a vitelogénese (P450arom ovário).

Como os estrogénios resultantes da actividade da aromatase actuam nos tecidos alvo

através de ligação a receptores nucleares específicos (ER) (Klinge, 2001; Nilsson *et al.*, 2001) a relação entre a expressão destes e da enzima poderá contribuir para elucidar o seu mecanismo de acção. Nos tetrápodes são conhecidos dois subtipos de receptores, ER α e ER β que actuam na forma de homodímeros ou heterodímeros (Klinge, 2001; Nilsson *et al.*, 2001). Nos peixes estão ainda presentes duas formas de ER β embora as suas funções ainda não estejam determinadas (Hawkins *et al.*, 2000; Socorro *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2006).

Os objectivos deste trabalho foram 1) a clonagem dos mRNA para as duas isoformas de P450arom e 2) a análise da sua expressão durante a ontogenia e em diferentes tecidos na tilápia moçambicana bem como a sua comparação com a expressão dos ER α e ER β por *Northern blot* e RT-PCR (transcriptase reversa - reacção de polimerase em cadeia). Um relatório preliminar deste trabalho foi publicado (Cruz & Canario, 1999).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS EM CATIVEIRO

O stock de tilápias utilizado teve a mesma origem do utilizado no capítulo anterior. Os peixes foram mantidos em tanques de fibra de vidro com 0.2m³, com água doce descloronizada, em circuito fechado com circulação constante, garantida por um sistema de *air-lift* associado a um filtro de fundo. Todos os aquários foram mantidos em condições naturais de fotoperíodo e a 26°C. Os aquários foram equipados com uma camada de areia que funcionava como filtro biológico, permitindo simultaneamente a construção dos ninhos. Cada tanque continha uma única família composta por um macho e quatro fêmeas, para simular um sistema social poligínico e evitar confrontos entre machos rivais.

3.2.1.1 Ovos e larvas

Os tanques experimentais foram observados duas vezes por dia (ao início da manhã e ao final do dia) para que fossem detectadas as fêmeas em incubação bucal num intervalo de

tempo não superior a 12 horas. Sempre que as posturas foram detectadas, fez-se a sua recolha com a ajuda de uma rede, tendo em seguida sido transferida para incubadores verticais situados dentro de aquários de 65 l equipados com filtro biológico. A circulação de água dentro dos incubadores foi assegurada por um sistema de “*air-lift*” (Figura 17) que permitia a movimentação de ovos e embriões e o consequente arejamento indispensável à oxigenação da prole. A temperatura de cultivo das larvas foi de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$.

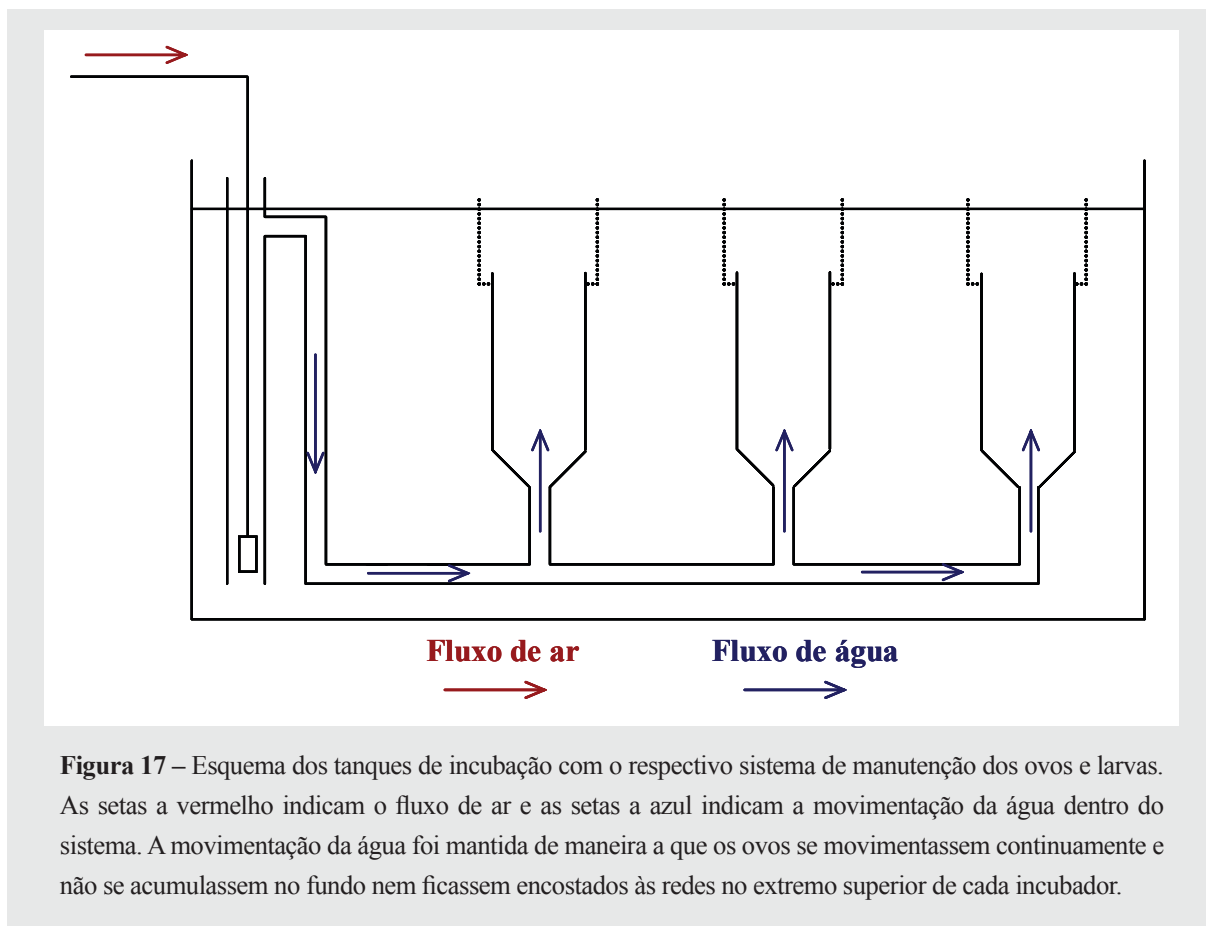


Figura 17 – Esquema dos tanques de incubação com o respectivo sistema de manutenção dos ovos e larvas. As setas a vermelho indicam o fluxo de ar e as setas a azul indicam a movimentação da água dentro do sistema. A movimentação da água foi mantida de maneira a que os ovos se movimentassem continuamente e não se acumulassem no fundo nem ficassem encostados às redes no extremo superior de cada incubador.

As amostras de ovos e larvas foram feitas sempre que necessário, recorrendo às posturas em desenvolvimento nos tanques de incubação.

3.2.2 RECOLHA DE TECIDOS

A recolha dos tecidos utilizados para a extração de RNA total e consequente síntese de cDNA, para a construção de bancos de cDNA e para a análise de expressão tecidual

através de RT-PCR, foi realizada utilizando fêmeas adultas em vitelogénese activa e machos adultos exibindo colorações nupciais intensas e, simultaneamente, comportamento de construção de ninhos. Todos os indivíduos foram sacrificados por decapitação após anestesia com 2-fenoxietanol, (0.1%, v/v; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Todos os tecidos foram recolhidos em condições de esterilidade, congelados em azoto líquido e armazenados a -70°C até posterior utilização para extracção de RNA total.

Para a análise da expressão dos genes em tecido de ovário e cérebro de fêmeas em diferentes estádios de ovulação, as fêmeas foram sacrificadas ao fim períodos diferentes após ter sido detectada a ovulação.

Para a análise da expressão dos genes durante o desenvolvimento larvar, foram recolhidas duas posturas fertilizadas com aproximadamente 800-1000 ovos cada, directamente a partir da boca de progenitoras adultas, num intervalo de tempo inferior a duas horas após a fertilização. As posturas foram incubadas a 26°C num tanque separado dentro de incubadores preparados com um sistema de circulação de água. Em dias alternados foram recolhidas amostras de ovos e larvas (aproximadamente 300mg) desde o dia um até o dia 31 após a fertilização, e imediatamente congelados em azoto líquido.

3.2.3 EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA

A extracção de RNA total foi feita a partir de larvas individuais ou de aproximadamente 100mg de cada tecido, utilizando TRI Reagent™ (Sigma-Aldrich), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Os tecidos utilizados foram: cérebro (Br), ovário (Ov), rim (Kd), fígado (Lv), testículo (Tt), rim anterior (Hk), coração (Ht), vesícula biliar (Gb), brânquias (Gl), pituitária (Pt) e músculo estriado branco (Ms). Dos RNA totais extraídos de cérebro e de ovário, foram purificados RNA poly(A)+ destinados à construção de bancos de cDNA e a análise por *Northern blot* usando colunas de oligo(dt) cellulose (mRNA Purification Kit, Amersham Biosciences, Lisbon, Portugal). A qualidade do RNA, o seu grau de pureza relativa bem como a sua concentração foram medidas utilizando um espectrofotómetro (GeneQuant – Pharmacia). A qualidade do RNA foi ainda confirmada através da visualização

com brometo de etídio em electroforese num gel de agarose a 1% em solução tampão TBE. Todas as amostras foram armazenadas em água a -80°C até serem utilizadas.

3.2.4 ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os fragmentos de RNA ou de DNA foram separados em electroforese em gel de agarose (0.8-1.5% em solução tampão TBE 1x, anexo III) com brometo de etídio ($0.5\mu\text{g/ml}$). A visualização das dimensões de cada fragmento de DNA foi efectuada através da comparação com um marcador de pesos moleculares (1Kb plus DNA ladder, Gibco BRL, Barcelona, Espanha) (Figura 18). A voltagem utilizada neste processo foi de aproximadamente de 8V/cm de gel. Após a separação estar terminada, o resultado foi visualizado num transiluminador de luz ultravioleta e fotografado utilizando o *Image Master VDS* (Pharmacia Biotech)

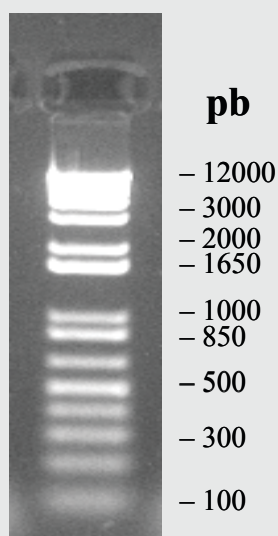


Figura 18 – Marcador de peso molecular 1Kb-plus utilizado para avaliação dos tamanhos dos insertos.

3.2.5 PRODUÇÃO DAS SONDAS DE cDNA

Inicialmente a transcrição inversa foi feita utilizando RNA total ($3\mu\text{g}$) extraído do ovário e usando também 40 unidades de MMLV-RT (Gibco BRL, Barcelona, Spain), 50pmol de oligo(dT)12-18 *primer* (Pharmacia Biotech) 0.05M Tris-HCl, pH 8.3, 0.075M KCl,

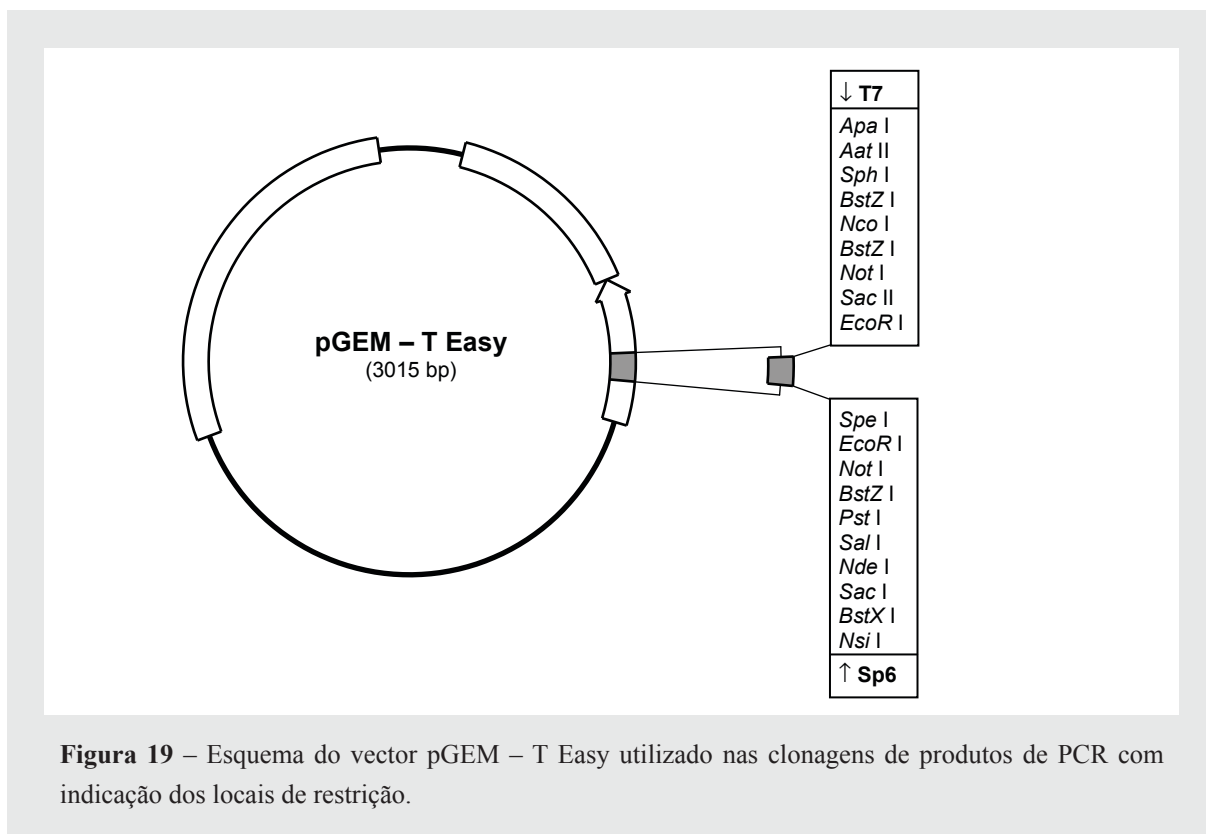
3mM MgCl₂, 0.01M DTT, 1mM dNTP, 3.2U de inibidor de Rnase num volume final de reacção de 40µl. A reacção foi incubada durante 2h a 37°C. O cDNA foi amplificado por RT-PCR utilizando *primers* específicos (Tiarm – Tabela 5) dirigidos a regiões conservadas da sequência da aromatase do ovário da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) (Chang *et al.*, 1997). Os *primers* foram escolhidos usando o *software Primer Premier* (Premier Biosoft, Palo Alto, US). A amplificação por RT-PCR foi feita com 5µl do cDNA sintetizado anteriormente, Taq DNA polymerase (2.5U, Promega, Madison, WI) e 25pmol de cada *primer* num volume final de reacção de 50µl (10mM Tri-HCl, pH 9, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5mM MgCl₂, 1mM dNTP). O protocolo do termociclador foi composto por uma desnaturação inicial a 95°C (1min), seguida de 30 ciclos compostos por 95°C, 1min; 62°C, 2min; 72°C, 1min. Foi ainda utilizada uma extensão final de 5min a 72°C.

Desta reacção foi obtido um fragmento com aproximadamente 300 pares de bases (pb) correspondente à P450arom ovário da tilápia moçambicana. Este fragmento foi utilizado como sonda para a pesquisa ao banco de cDNA de ovário (secção 3.2.8). Após isolado o clone completo, foi preparado um fragmento de restrição ApaI com 1200pb, contendo uma parte da região codificante para pesquisa de um banco de cDNA de cérebro (secção 3.2.8).

3.2.6 CLONAGEM DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos de PCR foram purificados após separação por electroforese em gel de agarose, utilizando um de dois kits de purificação: “*Quiagen Gel Extraction Kit*” (Quiagen, Alfacene, Lisbon, Portugal) ou “*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (Pharmacia Biotech).

Os cDNAs purificados foram clonados no Vector “pGem-T easy” (Promega, Figura 19) na zona de inserção da enzima EcoR-I. A ligação dos fragmentos ao vector foi feita durante a noite a 4°C numa mistura contendo 7µl de DNA purificado, 1µl de vector (50ng), 1µl de tampão para T4 DNA ligase 10x concentrado (para uma concentração final de 30mM tris-HCl pH 7.8, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP) e 1µl de T4 DNA ligase (3U), para um volume final de reacção de 10µl.



A transformação foi feita em 100µl de células competentes de *E. coli* (estirpe *XLI-blue MRF'*) (anexo II), utilizando 5µl do volume final da ligação, e incubando 45min no gelo. Após um choque térmico (42°C, 2min.) as células foram plaqueadas em LB agar /ampicilina/IPTG/X-Gal (anexo II) e incubadas durante a noite a 37°C. As colónias brancas detectadas, presumivelmente contendo insertos, foram repicadas para 4 ml de meio líquido (LB broth – anexo II) contendo ampicilina (50µg/ml), onde cresceram a 37°C com agitação vigorosa durante a noite (12-16h). A purificação do DNA ligado ao plasmídeo foi feita utilizando o kit de purificação “*Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System*” (Promega, Spain).

A confirmação de que os fragmentos de DNA se tinham ligado ao vector foi obtida digerindo 2µl de Miniprep com EcoR-I durante 1h a 37°C, e visualizados os resultados em gel de agarose com brometo de etídio. Posteriormente, para confirmar a identidade dos insertos foram sequenciados manualmente usando o kit de sequenciação “*T7 sequencing Kit*” (Amersham Biosciences) e a sequência obtida foi confirmada tendo sido utilizada por comparação com sequências conhecidas usando BlastX (Altschul *et al.*, 1997) através

da interface web do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

3.2.7 CONSTRUÇÃO DOS BANCOS DE cDNA DE CÉREBRO E DE OVÁRIO DE TILÁPIA

Foram construídos dois bancos de cDNA a partir de mRNA do ovário e do cérebro de *O. mossambicus*. Foi utilizado o vector UNI-ZAP XR (Stratagene, La Jola, CA) que permite a clonagem direccional do cDNA o que se revela vantajoso para a caracterização e sequenciação dos clones isolados a partir destes bancos. A produção dos bancos foi feita a partir de cDNA obtido por transcrição inversa de RNAm poly(A)⁺ de ovários de 5 fêmeas (banco do ovário) e de cérebros de seis machos dominantes (banco de cérebro). O processo foi idêntico para ambos os bancos de cDNA e a síntese de cDNA iniciou-se com 5µg de mRNA, usando o kit *UNI-ZAP XR cDNA cloning synthesis* (Stratagene, La Jolla, CA). A reacção de síntese da primeira cadeia do cDNA foi feita num tubo Eppendorff estéril de 1.5ml de capacidade num volume total de reacção de 50µl com os seguintes componentes: 5µl de tampão 10x concentrado para a síntese de primeira cadeia (composição não fornecida pelo fabricante – first-strand buffer), 3µl de mistura para a primeira cadeia de metil nucleótidos, 2µl de *primer-linker* (5'-GAGAGAGAGAGACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'; 1.4µg/µl), 1µl de inibidor de RNase (40U/µl), água tratada com DEPC (anexo I). Antes da adição do mRNA os reagentes foram misturados após o que foram brevemente centrifugados para que se concentrassem no fundo do tubo. O RNAm (5µg) foi ressuspenso em água-DEPC, desnaturado durante 10min a 65°C e cuidadosamente adicionado à reacção, pipetando repetidas vezes para facilitar a mistura. Após 10min à temperatura ambiente para permitir a ligação do primer ao mRNA foi adicionado 1.5µl da enzima MMLV-RT (50 U/µl). A reacção de síntese da primeira cadeia de cDNA decorreu durante uma hora a 37°C, após o que a reacção foi interrompida colocando o tubo no gelo.

Para a síntese da segunda cadeia de cDNA, foram adicionados 45µl da reacção de síntese da primeira cadeia num Eppendorf em gelo, seguidos de 20µl de tampão 10x concentrado específico para a síntese da segunda cadeia (second-strand buffer, cuja composição não

foi fornecida pelo fabricante), 6µl de mistura de metil nucleótidos para a segunda cadeia, 116µl de água estéril, 2µl de RNase H (1.5 U/µl) (com o objectivo de remover o RNAm) e 11µl de DNA polimerase I (9U/µl). Após a adição de todos os componentes, o tubo foi agitado num vórtex e centrifugado para concentrar a reacção no fundo do tubo. Seguiu-se incubação a 16°C durante 2.5h após o que o tubo foi de novo colocado em gelo.

Para o *blunting* das terminações do cDNA foram adicionados ao volume total da reacção anterior, 23µl de mix de dNTP para *blunting* e 2µl de *pfu* DNA polimerase recombinante (2.5U/µl) decorrendo a incubação durante 30min a 72°C. Os produtos de reacção foram extraídos com 200µl de uma solução de fenol básico/clorofórmio (1:1) e a fase aquosa transferida para um novo tubo estéril de 1.5ml. Uma segunda extracção foi feita adicionando 200µl de clorofórmio à fase aquosa e centrifugando durante 2min a 12000rpm. A fase aquosa (sobrenadante) foi de novo recolhida para um tubo estéril idêntico e precipitada durante a noite a -20°C com 20µl de acetato de sódio 3M e 400µl de etanol absoluto previamente arrefecido a -20°C. O DNA foi recuperado por centrifugação durante 60min a 4°C, o sobrenadante removido e o resíduo (*pellet*) seco ao ar até não existir qualquer vestígio de etanol. Depois de seco, o *pellet* foi ressuscitado numa solução contendo adaptadores para a enzima EcoR-I (0.4µg/µl) e incubado a 4°C durante 30min.

A ligação dos adaptadores da EcoR-I foi desempenhada utilizando 8µl do cDNA ressuscitado na mistura referida anteriormente aos quais foram adicionados 1µl de tampão específico para a ligase (500mM tris-HCl, pH 7.5, 70mM MgCl₂, 10mM DDT), 1µl de ATP (10mM) e 1µl da enzima T4 DNA ligase (4U/µl). A reacção foi incubada a 4°C durante 18h, no fim das quais a T4 DNA ligase foi inactivada pelo calor durante 30min (a 70°C). No fim deste período, o tubo foi colocado à temperatura ambiente para arrefecer lentamente durante 5min e posteriormente centrifugado para depositar a solução no fundo do tubo.

Os terminais dos adaptadores EcoR-I foram fosforizados por adição 1µl de tampão de ligação (ligase buffer), 2µl de ATP (10mM), 6µl de água estéril e 1µl de T4 Polinucleotide Kinase (10U/µl), perfazendo um volume final de reacção de 21µl e incubação durante 30min a 37°C. Depois de arrefecer à temperatura ambiente (aproximadamente 24°C), o cDNA fosforilado foi digerido adicionando 3µl da endonuclease de restrição XhoI e 28µl

de tampão específico para esta enzima (cuja composição não foi fornecida pelo fabricante) no volume total da reacção anterior por incubação a 37°C durante 1.5 horas. O volume total da reacção foi ajustado a 120µl adicionando 68µl de tampão STE 1x (0.1M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM EDTA) e o cDNA foi extraído com idêntico volume de fenol/clorofórmio, sendo a fase aquosa transferida para um tubo novo.

A purificação do cDNA com os adaptadores EcorI/XhoI foi efectuada utilizando colunas Sephacryl® (Pharmacia Biotech) previamente preparadas equilibrando a resina com 2 ml de solução tampão 1x STE. A solução tampão foi aplicada no topo da coluna e a eluição por centrifugação da coluna a 400g durante 2min. O processo foi repetido duas vezes. Após a segunda centrifugação, a coluna foi inserida num tubo Falcon de 15ml, estéril, e o volume total da reacção aplicado no topo da matriz, eluindo o cDNA por centrifugação também a 400g durante 2min. O cDNA foi misturado em diferentes quantidades com 1µg de vector UniZap-XR, para que diferentes proporções de vector e de cDNA estivessem presentes em cada mistura, com o objectivo de otimizar as proporções destes componentes para uma ligação ideal. A reacção foi completada para um volume final de 32µl, utilizando para o efeito diferentes quantidades de 1x STE para cada mistura. As diferentes misturas de cDNA e vector foram co-precipitadas utilizando 1µl de 3M NaAc e 60µl de etanol gelado absoluto e em seguida colocadas a -70°C durante 2 horas. O precipitado foi recuperado por centrifugação (10000g durante 10min a 4°C) e o pellet ressuscitado em 3.5µl de água estéril a que foram adicionados 0.5µl de tampão de ligação 10x concentrado, 0.5µl de ATP 10mM e 0.5µl de T4 DNA ligase (4U/µl) para completar a reacção de ligação. O processo decorreu durante a noite a 12°C.

Para o empacotamento (*packaging*) do cDNA ligado ao vector, foi usado o Kit de clonagem Gigapack® III Gold (Stratagene). Cada ligação (4µl) foi adicionada a um extracto de *packaging* rapidamente descongelado e misturado com auxílio da ponta da pipeta. A reacção foi incubada durante 1h45min à temperatura ambiente e a reacção foi então terminada adicionando 500µl de tampão SM (anexo II) e 20µl de clorofórmio. Após um vórtex e uma centrifugação rápida (30s), o sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo e utilizado para a titulação e amplificação do banco de cDNA.

3.2.7.1 Titulação dos bancos de cDNA

A titulação dos bancos de cDNA permite quantificar o número de fagos recombinantes presentes em cada banco. A presença de um inserto (cDNA) na região *poly-linker* do vector produz uma disrupção do gene *lac Z* dando origem a uma pfu (plaque forming unit) com gene de β -galactosidase inactivo. Se não existe nenhum cDNA inserido no vector, a região N-terminal da enzima β -galactosidase é expressa. Assim quando o banco é plaqueado em NZY agar contendo o substrato de β -galactosidase os pfu não recombinantes apresentam um tom azulado e os recombinantes são transparentes. Neste processo é esperado que as placas recombinantes sejam expressas numa ordem de grandeza que varie entre 10 a 100 vezes superior às das placas não recombinantes.

Os bancos de cDNA foram diluídos de 1:10 em tampão SM e volumes de 1 e 10 μ l foram cuidadosamente adicionados separadamente a 200 μ l de células hospedeiras de *E. coli* XL1-*Blue* MRF' e incubados a 37°C durante 10min. Após esta incubação, as células foram misturadas em 10ml de top agar (anexo II) contendo 15 μ l de IPTG (0.5M) e 50 μ l de X-Gal (250mg/ml) e plaqueadas em placas de petri quadradas (12x12cm) previamente preparadas com meio NZY (anexo II). Após incubação a 37°C durante a noite, todas as placas transparentes e azuis foram contadas e o número total de pfu (unidades formadoras de placas) presentes nos bancos foram calculados da seguinte forma:

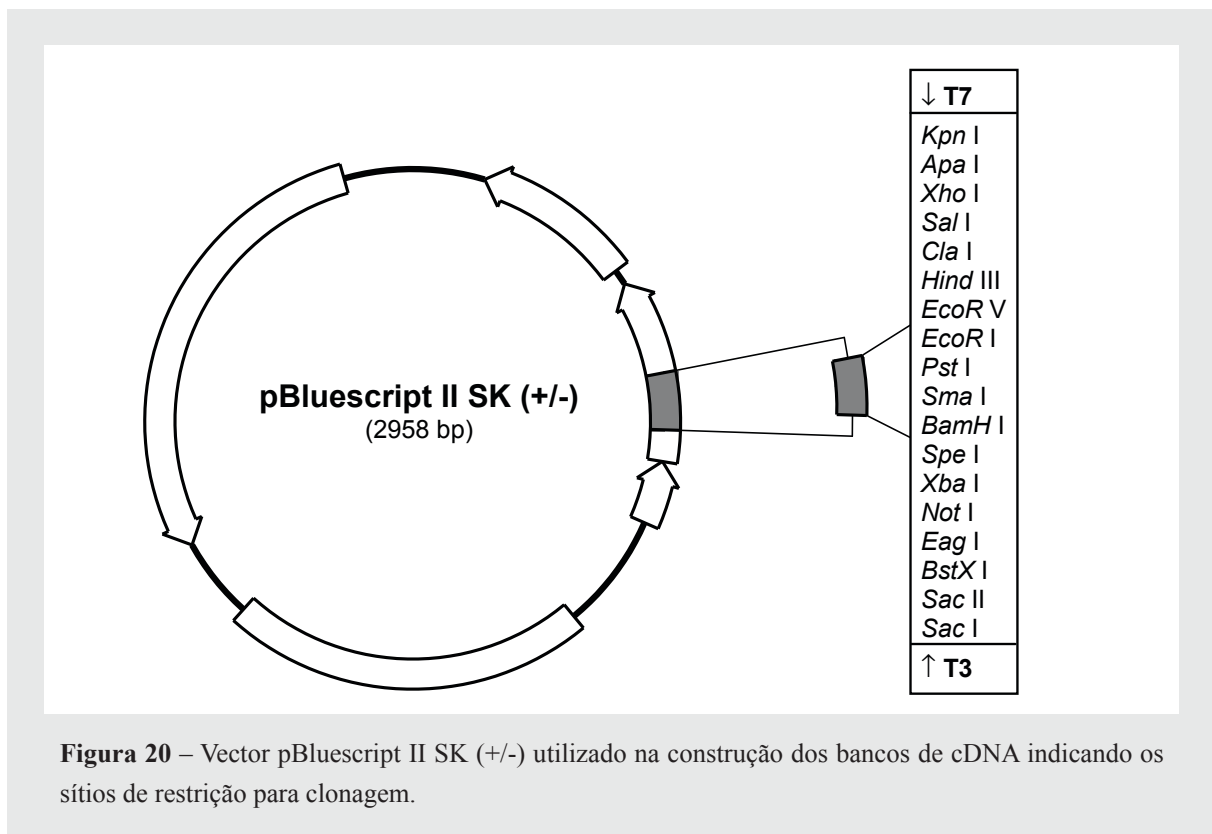
$$\frac{(n^{\circ} \text{ pfu}(\text{transparentes} + \text{azuis}) \times f.\text{diluição} \times v.\text{total})}{v.\text{plaqueado}}$$

A percentagem de recombinantes presentes nos bancos foi determinada contando a proporção de placas transparentes (recombinantes) e azuis (não recombinantes):

$$\left(\frac{n^{\circ} \text{ pfu}(\text{transparentes})}{n^{\circ} \text{ total pfu}(\text{transparentes} + \text{azuis})} \right) \times 100$$

3.2.7.2 Avaliação da dimensão dos insertos do banco de cDNA

Para a determinação do tamanho médio dos insertos, foram recolhidas aleatoriamente 10 placas transparentes a partir das placas de NZY. O plasmídeo pBluescript SK(+/-) (Figura 20) foi excisado *in vitro* e em seguida digerido com EcoRI e XhoI libertando desta forma os insertos aí contidos que foram fraccionados em gel agarose 0.8% com marcador 1Kb para determinação do tamanho aproximado.



3.2.7.3 Amplificação dos bancos de cDNA

Para amplificação dos bancos de cDNA, alíquotas de cada banco foram misturadas com 600µl de células hospedeiras XL1-blue e incubadas a 37°C durante 15min. A mistura foi adicionada a 10ml de Top agar como descrito anteriormente e plaqueada em placas de petri quadradas contendo meio NZY. As placas foram incubadas durante 8 horas a 37°C após o que cada placa foi coberta com 8ml de tampão SM e armazenadas a 4°C durante a noite para permitir a difusão dos fagos para o tampão. A suspensão foi então recuperada para um frasco estéril e foram adicionados mais 2ml de tampão SM a cada placa, também

recolhidos para o mesmo recipiente. A esta solução foi adicionado clorofórmio a uma concentração final de 5%, misturado e incubado à temperatura ambiente durante 15 min. Os restos celulares foram removidos por centrifugação (500g durante 10min. à temperatura ambiente) e o sobrenadante contendo o banco de cDNA amplificado transferido para um novo recipiente estéril. Os bancos foram armazenados a 4°C com 0.3% clorofórmio ou a -80°C com 7% DMSO. A titulação final foi calculada como descrito anteriormente.

3.2.8 PESQUISA DOS BANCOS DE cDNA

3.2.8.1 Pesquisa primária

Na pesquisa primária dos bancos de cDNA foram plaqueadas aproximadamente 50000pfu em placas quadradas de 12mm com meio NZY. Para o efeito, foram preparadas 8 alíquotas de 10µl das diluições apropriadas (em tampão SM) de cada banco e incubados com 600µl de células hospedeiras XL1-blue durante 15min. a 37°C. Esta mistura de fagos e de células hospedeiras foi adicionada a 10ml de top agar aquecido previamente a 48°C e colocado sobre as placas com NZY. As placas foram incubadas a 37°C durante aproximadamente 8 horas e arrefecidas pelo menos durante 2h a 4°C, antes de se proceder à transferência de DNA para membranas de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham). Foram preparadas duas réplicas de cada placa. Na primeira, a membrana permaneceu em contacto com o agar durante dois minutos, tendo nesta altura sido marcada com três pontos de orientação assimétricos feitos com a ponta de uma agulha estéril. Na segunda a membrana permaneceu em contacto com o agar durante quatro minutos e foi marcada com exactamente os mesmos pontos de orientação. Após este processo, o DNA ligado às membranas foi sequencialmente desnaturado (1.5M NaCl, 0.5M NaOH), neutralizado (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl) e, por fim, equilibrado (em 6xSSC) (soluções descritas no anexo I), tendo cada um dos passos ocorrido por imersão nas respectivas soluções durante 5min. Após este processo, as membranas permaneceram em contacto com papel Whatman® 3mm até estarem secas. O *crosslink* do DNA às membranas foi feito aquecendo-as a 80°C durante 2h. As placas de NZY com fagos foram armazenadas a 4°C até serem usadas para isolamento de potenciais placas pfu positivas.

3.2.8.2 Marcação das sondas de cDNA

As sondas produzidas em I.2.5 foram utilizadas para pesquisar os bancos de cDNA a partir de 25ng de DNA purificado e ressuspendido em 45µl de água estéril. Após desnaturação a 95° durante 5min a sonda foi adicionada à mistura de *Rediprime* (*Rediprime random labelling kit*, Amersham Biosciences, UK) seguido de 5µl de [α -³²P-dCTP] cuidadosamente misturados por pipetagem. A reacção foi incubada a 24°C durante uma hora e o volume da reacção foi ajustado com 150µl de água estéril. A sonda marcada foi desnaturada a 95°C durante 5min e imediatamente colocada em gelo onde permaneceu 2min antes de ser adicionada à solução de hibridação sem purificação prévia.

3.2.8.3 Pré-hibridação e hibridação das membranas

As membranas com DNA, no máximo de 8 por tubo de hibridação, foram sujeitas a pré-hibridação com aproximadamente 40ml de solução de hibridação (6x SSC, 5x Denhart's, 0.1% SDS e 0.1mg/ml RNA de transferência: informação detalhada no anexo XX) a 65°C durante 2h. Após este período foi adicionada a sonda marcada (0.5-2x10⁶cpm/ml), procedendo-se à hibridação durante a noite, durante 16 ou mais horas. Os *screenings* feitos às membranas preparadas em duplicado foram realizados sob condições de elevada estringência, idênticas às utilizadas durante a pré-hibridação.

Após a hibridação, as membranas foram lavadas em 0.1xSSC/0.1% SDS a 65°C, com renovação de solução em cada 10 min até que as contagens da solução de lavagem fossem inferiores a 5 contagens por segundo (cps). Quando o sinal de fundo deixou de ser detectado nas membranas, estas foram cuidadosamente envolvidas em plástico, tendo os duplicados sido dispostos lado a lado, e expostas a um filme radiográfico (Biomax MS film – KodaK), dentro de uma cassette de revelação, a -70°C durante um período que variou entre 1 a 3 dias.

Foram considerados como potencialmente positivos os clones que hibridaram com a sonda simultaneamente nas membranas duplicadas. Nesses casos a região correspondente

na placa de NZY foi recolhida com o auxílio de uma ponta plástica de pipeta de 1 ml invertida (Gilson pipetmann). Os fagos respectivos foram eluídos por agitação durante 4-5h em 500ml de tampão SM e 20 μ l de clorofórmio.

3.2.8.4 Pesquisas secundária e terciária dos bancos de cDNA

Na pesquisa secundária seguiu-se o processo descrito para a pesquisa primária e hibridação, mas neste caso as membranas foram obtidas a partir de placas preparadas através da adição de 1-5 μ l de uma diluição de 1:1000 dos potencialmente positivos isolados a partir da pesquisa primária, em 200 μ l de células hospedeiras, produzindo desta forma entre 500-1000pfu por placa. O tempo de exposição do filme que foi também ajustado para ser inferior a 3h. Os possíveis positivos foram recolhidos individualmente das placas de agar com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur* de vidro e colocados dentro de 250 μ l de tampão SM e 10 μ l de clorofórmio. Nos casos em que não foi possível isolar individualmente os clones, recorreu-se a um *screening* terciário fazendo uma nova diluição a partir da placa de NZY secundária seguindo a mesma metodologia para isolar completamente as pfu pretendidas.

3.2.8.5 Excisão *in vitro* do vector pBluescript

O vector pBluescript foi excisado utilizando 100 μ l de solução tampão SM contendo os fagos potencialmente positivos, a que se adicionaram 200 μ l de células hospedeiras (XL1-Blue) e 1 μ l de *ExAssist helper phage* ($> 1 \times 10^6$ pfu/ μ l). A solução foi incubada durante 15min a 37°C, após o que lhe foram adicionados 3ml de meio LB Broth (anexo II) e de novo incubada durante 2-3 horas a 37°C com agitação. Os tubos contendo a solução foram aquecidos a 70°C durante 20min e centrifugados a 1000g durante 15min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido para um novo tubo e 1 μ l desta solução adicionada a 200 μ l de células hospedeiras SOLR (anexo II). A mistura foi incubada a 37°C durante 15min e 30 μ l desta solução plaqueada em placas de petri circulares contendo LB/ampicilina (anexo II), que permaneceram durante a noite a 37°C.

Foram recolhidas colónias individuais a partir das placas que serviram para inocular 5ml de meio líquido LB broth com ampicilina (50 μ g/ml) que foram de novo incubadas durante a noite a 37°C com agitação. O plasmídeo foi purificado utilizando o kit de purificação de DNA *Wizard Plus SV Miniprep DNA purification System* (Promega). A presença do inserto e a confirmação do seu tamanho foram aferidas digerindo os plasmídeos purificados com duas endonucleases de restrição, EcoR1 e Xho1, tendo o resultado sido visualizado após separados os fragmentos por electroforese em gel de agarose 1.5% em TBE/Brometo de etídio (anexo III).

3.2.8.6 Preparação do plasmídeo, sequenciação e análise

O DNA plasmídico isolado usando o procedimento da lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) seguido de extracção do DNA com fenol. Os insertos foram sequenciados com um sequenciador automático (ABI 373) usando o *primer* T3 de sequenciação na região polylinker do pBluescript que flanqueia a região 5' do inserto de cDNA. Como os bancos de cDNA foram construídos por clonagem direccionada, isso implica que todos os insertos de cDNA se encontravam inseridos no vector segundo a mesma orientação. A qualidade das sequências foi avaliada e as sequências do vector e polylinker removidos. A identidade das sequências foi determinada por pesquisa com os algoritmos BlastX e Blastn (versão 2.0, National Center for Biotechnology Information, Altschul *et al.*, 1997) no servidor <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. As coincidências foram consideradas estatisticamente significativas quando foi obtida uma identidade de sequência superior a 65% para um “score” maior que 40 e um valor de E (E-value) inferior a 10⁻⁵ (Martins *et al.*, 2001). Os clones positivos foram sequenciados na íntegra pelo menos duas vezes a partir dos flancos 5' e 3', neste caso utilizando o primer T7. As sequências foram alinhadas utilizando o software DNASIS (versão 5.0), com o qual se obteve também a sua tradução em aminoácidos. Os clones isolados neste estudo encontram-se referenciados no *genebank* com os seguintes códigos de acesso: AF135850 (F3BR3) and AF135851 (3OV1).

3.2.9 ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE AROMATASE

As sequências de aromatase disponíveis em *Genbank* e as obtidas neste trabalho foram alinhadas utilizando ClustalX (versão 1. 64b, Thompson *et al.*, 1997). Os alinhamentos múltiplos obtidos foram editados e o grau de similaridade (Dstat analysis) entre elas obtido com o software GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997). O alinhamento obtido com ClustalX também foi utilizado em PAUP (Swofford, 1998) para a análise filogenética.

3.2.10 RT-PCR SEMI QUANTITATIVO

A distribuição e o nível de expressão das P450arom cérebro e ovário assim como dos ER α e ER β foi analisada por RT-PCR e comparados com os níveis de expressão obtidos para o gene β -actina que é considerado ter níveis constitutivos (gene “housekeeping”). As sequências dos *primers* utilizados encontram-se representadas na Tabela 5. Para a análise da expressão da aromatase da gónada foram utilizados os *primers* Tiarm, enquanto que os Tibr1 utilizados para análise da expressão da aromatase do cérebro foram desenhados a partir da sequência AF135850. Os *primers* referentes a ER α e a ER β foram baseados nas sequências disponíveis para *O. niloticus* com os números de acesso U75604 e U75605, e os da β -actina foram baseados na sequência de *Sparus aurata* com o número de acesso X89920. A identidade dos produtos de PCR foi confirmada por sequenciação e por comparação com outras sequências presentes na base de dados do *GeneBank*.

Tabela 5 – Referência, sequência e dimensão dos *primers* utilizados para a obtenção das sondas e para a análise por PCR semi-quantitativo. É também apresentada a informação sobre a temperatura de *annealing* e número de ciclos utilizados para obtenção das sondas.

Referência do Primer		Sequência	Informação sobre os ciclos	Sonda Obtida	Dimensão (pb)
Aromatase	Forward	5'GGCATAGGCACAGCCAGCAA3'	30 ciclos; annealing – 62°C	Armov	300
Tiarm	Reverse	5'CCAGGTGAGCCTGTATGGAGG3'			
Aromatase	Forward	5'TCTTAGCAGGACTCGGTCCAAT3'	30 ciclos; annealing – 63°C	Armbr	450
Tibr1	Reverse	5'AGATGTCCAACACGATGGCTCT3'			
ER α	Forward	5'AAACCACTTCAACACCCGTCTA3'	35 ciclos; annealing – 58°C	TiEra	360
	Reverse	5'TCCTTACGCATACCTCCTTCCA3'			
ER β	Forward	5'GCCAGCCCATCTGTATCCG3'	35 ciclos; annealing – 58°C	TiEr β	500
	Reverse	5'GCAGCTCTTACGGCGGTTTC3'			
β -actina	Forward	5'GGCCGCGACCTCACAGACTAC3'	25 ciclos; annealing – 57°C	Tiactin	260
	Reverse	5'ACCGAGGAAGGATGGCTGGAA3'			

O RNA total foi transcrito em cDNA como referido em 3.2.5 e as reacções de PCR foram feitas utilizando 5µl do cDNA sintetizado e nas mesmas condições já descritas (secção 3.2.5) para os *primers* Tiarm, com as seguintes excepções: *Tibr1*, 1.0mM MgCl₂, temperatura de annealing, 63°C, 30 ciclos para a distribuição da aromatase nos tecidos e 35 ciclos para determinar a sua expressão durante o desenvolvimento; Para os ERα e ERβ, 1.0mM MgCl₂, temperatura de annealing de 58°C, 35 ciclos; No PCR da β-actina as condições foram 1.25mM MgCl₂, 94°C 2 min, 25 ciclos com a rotina de 94°C 30 segundos, 57°C 45 segundos, 72°C 1.5min, seguido de uma extensão final de 5min.

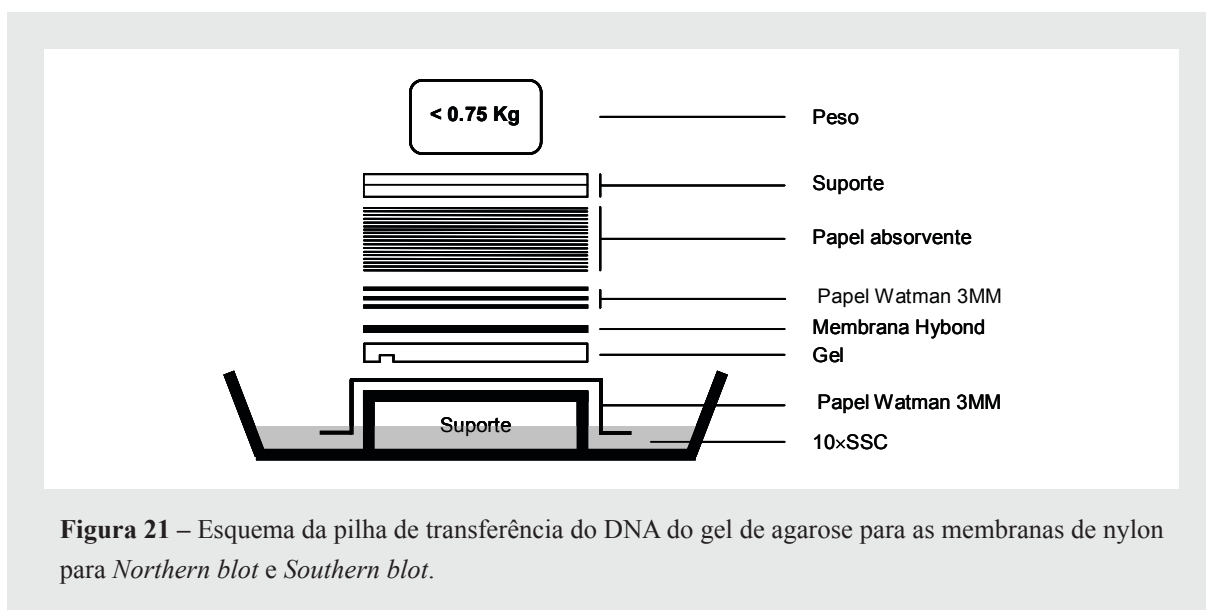
3.2.11 ANÁLISE POR *NORTHERN BLOT*

O número de transcritos produzidos por cada gene de aromatase e a sua dimensão foram analisados por *Northern blot*. Na análise por *Northern blot* foram utilizados dois conjuntos diferentes de RNA. Inicialmente, foi purificado RNA poly(A)⁺ a partir do RNA total do cérebro e do ovário (5µg de poly(A)⁺ a partir de cada tecido), com o objectivo de perceber se alguma das sondas produziria uma reacção cruzada. Utilizou-se ainda um segundo conjunto de RNA total que foi extraído de diferentes tecidos (10mg para cada tecido).

Para o *Northern blot* o RNA começou por ser fraccionado por electroforese num gel de MOPS/2.2% formaldeído/1.5% agarose (anexo III), utilizando MOPS 1x concentrado (anexo II) e o marcador de peso molecular 0.24-9.5 Kb RNA ladder (GibcoBRL). A voltagem aplicada para este processo de fraccionamento foi de 4-5 V por cada cm de gel. O RNA foi transferido por capilaridade para uma membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech), utilizando 10x SSC como tampão de transferência (Figura 21) durante a noite. Após a transferência para a membrana de nylon o RNA foi desnaturado e fixado à membrana (*cross-linking*) utilizando luz ultravioleta. Antes da hibridação as membranas foram lavadas durante 30min a 60°C com solução de lavagem (1x SSC, 0.1% SDS). As membranas foram pré-hibridadas a 58°C numa solução *Church Gilbert* (anexo I) durante 4h. A hibridação foi feita durante a noite, sob as mesmas condições que a pré-hibridação, tendo apenas sido adicionado à solução a sonda formada pelo cDNA do clone

completo da aromatase do ovário (3OV1) marcada com [α - 32 P] dCTP. Após a hibridação, a membrana foi lavada a 42°C em 0.1x SSC/0.1% SDS três vezes durante 10min e exposta a um filme auto-radiográfico Biomax MS (Kodak, Rochester, NY). As cassetes contendo as membranas em contacto com os filmes foram armazenadas a -70°C durante 5h.

Para que a mesma membrana pudesse ser hibridada com a segunda sonda para a aromatase do cérebro foi necessário lavá-la para completa remoção da primeira sonda (*striping*) numa solução a ferver de 0.1% SDS durante 30min, seguida de uma lavagem em 2x SSC à temperatura ambiente durante 15min. A membrana foi em seguida e seguindo a mesma metodologia re-hibridada com a sonda ArmBr1 de 1000pb, marcada com [α - 32 P] dCPT, obtida do cDNA proveniente do transcrito do cérebro e produzido por acção das endonucleases de restrição EcoRI e XhoI.



3.2.12 ANÁLISE POR *SOUTHERN BLOT* DOS PRODUTOS DE RT-PCR

Os produtos de RT-PCR foram separados por electroforese em gel de agarose (1.5%) em tampão TBE (anexo I), e o gel colocado numa solução de desnaturação (0.5M NaOH, 1.5M NaCl) onde permaneceu com agitação durante 15min, seguido de lavagem água estéril (2x2 min) e colocação em solução de neutralização. (1.5M NaCl, 0.5 Tris-HCl pH 8.0) durante

30min. Utilizando metodologia semelhante à descrito para o *Northern blot*, o DNA separado por electroforese foi transferido por capilaridade para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham Biosciences), e utilizando 10x SSC como tampão de transferência (Figura 21). Este processo ocorreu durante aproximadamente 16h após o que o DNA foi fixado à membrana por cross-linking, incubando as membranas a 80°C durante 2h.

A hibridação foi feita com as sondas obtidas no processo descrito nas secções 3.2.5 e 3.2.10, e cujas dimensões se encontram condensadas na Tabela 5, tendo todas elas sido preparadas como descrito para a marcação de sondas para o *screening* no ponto 3.2.8.2, bem como todo o processo de pré-hibridação e de hibridação. Cada uma das sondas detecta especificamente cada um dos genes a partir dos quais foi obtida. As membranas foram expostas a um filme radiográfico (Biomax MS films – Kodak) e armazenados em ecrãs intensificadores a -70°C até a obtenção do sinal apropriado.

3.2.13 EXPRESSÃO DE *CYP19A*, *CYP19B* E RECEPTORES DE ESTROGÉNIO α E β DURANTE O DESENVOLVIMENTO INICIAL

Os produtos da reacção da aromatase, receptores de estrogénios e da β -actina foram separados em gel de agarose (0.7%), desnaturados (1.5M NaCl/0.5M NaOH), neutralizados (1.5M NaCl/0.5M Tris Base, pH=8) e transferidos para membranas de nylon (Hybond XL, Amersham Pharmacia) numa solução de 6x SSC por um método padrão de capilaridade. As membranas foram hibridadas com sondas radioactivas marcadas com (α -³²P)CTP em solução de hibridação *Church Gilbert* a 65°C, e submetidas a lavagens de estringência (1x SSC/0.1% SDS e 0.1x SSC/0.1% SDS) a 65°C. Os sinais produzidos nas membranas foram quantificados por *phosphorimaging* (GS-505 Molecular Imager System, Biorad) e expressos como o rácio dos genes amplificados em relação ao gene da β -actina.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 BANCOS DE cDNA

Após a amplificação os bancos de cDNA do ovário e do cérebro continham 1×10^6 e 6×10^5 recombinantes primários respectivamente.

3.3.2 CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DOS HOMÓLOGOS DA AROMATASE

A pesquisa efectuada ao banco de cDNA de ovário da tilápia de Moçambique foi feita com a sonda **Armov** obtida por RT-PCT (Tabela 5) e produziu quatro clones positivos idênticos. O cDNA isolado referente a esta sequência (referido como 3OV1; número de acesso AF135851 do GenBank) apresenta um comprimento de 1783pb codificando uma proteína com 521 aminoácidos (Figura 22A). O putativo codão de iniciação, ATG, situou-se a +72pb da terminação 5' e a região traduzida que termina com um codão stop TAG encontra-se situada na posição +1596. A região 3' não traduzida (3'UTR) compreende uma cauda poly (A)⁺ com 16pb e o sinal de poliadenilação (AATAAA) encontra-se situado 18pb antes do primeiro A da cauda de poli (A)⁺.

A pesquisa do banco de cDNA de cérebro foi feita com o fragmento de restrição produzido com a enzima Apa I a partir da sequência de cDNA do clone 3OV1, que engloba grande parte da região mais conservada nas sequências de aromatase produziu seis clones positivos idênticos, tendo todos dimensões semelhantes e apresentando padrões também idênticos quando tratados com as enzimas de restrição Xho/EcoRI.


```

1      M V A D R A S E V T A A L L L L 16
1      gg cac gag gag gag etc acc gct ggc ccc ATG GTG GCT GAT AGA GCG TCA GAA GTC ACT GCT GCC CTG CTT CTT CTG 77
17     L L L L L L F T T W R Q R K Q S H I P G P F F L A G 42
78     CTG CTG TTG TTG CTG CTT TTC ACC ACC TGG AGA CAA AGA AAA CAG TCA CAC ATA CCA GGT CCT TTC TTC TTA GCA GGA 155
43     L G P I L S Y S R F I W S G I G T A C N Y Y N N K Y 68
156    CTC GGT CCA ATT CTC TCC TAC AGC AGA TTC ATC TGG TCT GGG ATT GGA ACA GCG TGT AAC TAC TAC AAC AAC AAA TAT 233
69     G S I V R V W I S G E E T L I L S R S S E V Y H V L 94
234    GGG AGC ATT GTG CCG GTG TGG ATA AGC GGA GAG GAG ACC CTG ATT TTG AGC AGG TCC TCT GAA GTG TAC CAC GTT TTG 311
95     R S A H Y T S R F G S K K G L E C I G M Y G N G I I 120
312    AGG AGT GCC CAC TAC ACC TCC AGA TTT GGG AGC AAA AAA GGA CTC GAG TGC ATC GGC ATG TAT GGA AAT GGT ATC ATT 389
121    F N S D V P L W K K V R T Y F S K A L T G P G L Q R 146
390    TTC AAC AGT GAT GTC CCG CTT TGG AAA AAA GTG AGA ACA TAC TTT TCT AAA GCT CTG ACT GGA CCC GGC CTG CAG AGG 467
147    T V G I C V S S T A K H L D N L Q D M T D P S G H V 172
468    ACC GTA GGA ATC TGT GTG AGC TCC AGA GCC AAA CAC CTG GAC AAC TTA CAG GAC ATG ACT GAC CCC TCT GGA CAT GTA 545
173    D A L N L L R A I V L D I S N R L F L R V P L N E K 198
546    GAT GCT CTC AAT CTG AGA GCC ATC GTG TGG GAC ATC TCC AAC CCG CTG TTC CTC AGA GTG CCG TTA AAT GAG AAA 623
199    D L L T K I H N Y F E T W Q T V L I K P D I F F K V 224
624    GAC TTA TTG ACG AAA ATT CAC AAC TAC TTT GAG ACC TGG CAA ACA GTT CTA ATA AAA CCA GAT ATA TTC TTC AAG GTT 701
225    G W L Y N K H K R A A Q E L Q D A M E S L L E V K K 250
702    GGA TGG CTG TAC AAC AAG CAT AAG AGA GCA GCA CAG GAG CTG CAA GAT GCG ATG GAG AGC CTG CTT GAA GTT AAG AAA 779
251    K M I H E A E K L D D E L D F A T E L I F A Q N H G 276
780    AAG ATG ATT CAT GAA GCC GAG AAG CTG GAC GAC GAG CTC GAC TTT GCA ACA GAG CTC ATC TTC GCC CAG AAC CAC GGA 857
277    E L S A D N V R Q C V L E M V I A A P D T L S I S L 302
858    GAG CTA TCA GCA GAT AAC GTC AGG CAG TGT GTG CTA GAG ATG GTG ATC GCA GCC CCT GAC ACA CTT TCC ATC AGC CTC 935
303    F F M L M L L K Q N P D I E L Q L V E E M N N I L N 328
936    TTC TTC ATG CTG ATG CTG CTG AAA CAG AAC CCG GAC ATA GAG CTG CAG CTA GTG GAG GAG ATG AAC AAC ATC TTG AAT 1013
329    E K D V E N I D Y Q S L K V M E S F I N E S L R F H 354
1014   GAA AAA GAC GTG GAA AAT ATC GAT TAC CAA AGC CTG AAG GTG ATG GAG AGC TTC ATC AAC GAG TCT TTG AGG TTT CAT 1091
355    P V V D F T M R K A L E D N D I A G T K I K K G T N 380
1092   CCT GTG GTC GAT TTC ACA ATG AGG AAA GCT CTG GAG GAC AAT GAC ATC GCA GGC ACA AAA ATC AAG AAG GGC ACC AAC 1169
381    I I L N I G L M H K T E F F P K P K E F N L T N F E 406
1170   ATC ATT CTC AAC ATT GGC CTC ATG CAC AAA ACC GAA TTC TTC CCC AAA CCT AAA GAG TTC AAC CTC ACG AAC TTT GAA 1247
407    K T V P S R Y F Q P F G C G G P R S C V G K H I A M V 432
1248   AAA ACG GTA CCC AGT CGT TAC TTC CAG CCC TTT GGC TGC GGG CCT CGT TCC TGT GTG GGC AAA CAC ATC GCC ATG GTG 1325
433    M M K A I L V T L L S R Y T V C P R Q G C T L N S I 458
1326   ATG ATG AAG GCC ATC CTG GTC ACT CTC CTG TCT CGG TAC ACT GTG TGT CCT CGT CAA GGC TGC ACG CTC AAC AGC ATC 1403
459    K Q T N N L S H Q P V E D E H S L A M R F I P R T T 484
1404   AAG CAG ACC AAC AAC CTG TCA CAC CAG CCA GTG GAA GAC GAG CAC AGC CTG GCC ATG GCG TTC ATC CCA CGA ACG ACA 1481
*
1482   taa ccc cat gac aac aag ctg cga aac ata aca gcg ctt ttt aca ctt cag atg aaa aca tct tga aat ggg tgt aaa 1559
1560   ggc ctt aat gaa gtc ctg tac tag gaa ata cta aca gta aat ttg tat taa cag cac atg cac gcc aaa ttc aac ttt 1637
1638   act aat ctt taa aaa aat aca ctt gtt aag tag agt ttt ctg att cat gtt ttg aca gtg tac aca gct cat act ttt 1715
1716   aat aaa gat cca ttt gca atg aaa aaa aaa aaa aaa aaa a 1755

```

Figura 22B – Sequência do clone F3BR3, com a indicação da localização do início da sequência e do códon stop.

3.3.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os dois clones (3OV1 e F3BR3) isolados a partir dos tecidos de *O. mossambicus* contêm a assinatura característica de citocromo P450 com as cisteínas para ligação ao átomo de ferro do grupo heme e, através de pesquisa com BLAST, a identidade é mais elevada para a aromatase codificada pelo gene *Cyp19*. As duas sequências apresentam 57% de identidade entre si. A comparação dos alinhamentos das sequências de proteínas de aromatase diferentes vertebrados e a sua análise filogenética utilizando máxima parsimónia revelou a existência de dois grandes ramos (Figura 23). Um destes ramos corresponde às sequências pertencentes aos



teleosteos, e o segundo corresponde à seqüência dos peixes cartilágineos com os tetrápodes. A análise efectuada por Dstat confirmou a existência de diferenças significativas na identidade dos resíduos identificados entre os teleosteos e o grupo composto pelos tetrápodes e pelos condríctios (Dstat=0.614; KSpr=2.12x10⁻³⁸). O grupo das seqüências dos teleosteos pode ainda ser subdividido em dois grandes grupos (Dstat=0.3956; KSpr=0.006220), o primeiro grupo (1) que inclui a seqüência 3OV1 e o segundo grupo (2) que inclui a seqüência F3BR3. O grupo 1 parece ainda poder ser dividido em mais dois subgrupos (Dstat=0.52381; KSpr=0.00726228),

o subgrupo 1A contendo sequências de elementos pertencentes às famílias Ciprinidiformes e Syluriformes, e o subgrupo 1B, contendo sequências de Salmonidiformes, Pleuronectiformes, Cyprinodontiformes e Perciformes.

A análise da composição em aminoácidos usando a base de dados *Prosite* confirmou a assinatura do citocromo P450 que para o grupo 2 dos teleósteos é representado pela sequência de consenso F-G-C-G-P-R-(A,S)-C-V-G, em que a primeira C é substituída por S quando passamos para o grupo 1 dos teleósteos e com um I opcional no lugar de V. No grupo referente aos condríctios e aos tetrápodes, as mesmas posições podem apresentar respectivamente F ou S e A ou V. Adicionalmente uma G constitui uma terceira possibilidade para o sétimo aminoácido.

Verificou-se um elevado grau de conservação das características físico-químicas ao longo de quase todas as moléculas com excepção das regiões terminais, como também se verificou existir especificidade na composição dos aminoácidos dos grupos e subgrupos identificados. O grupo dos condríctios e dos tetrápodes apresentaram um valor médio de 503 resíduos de aminoácidos (variando entre 496 e 511, n=23) semelhante ao grupo dois dos teleósteos com um valor médio de 506 resíduos (variando entre 495-511, n=7), mas bastante diferente do grupo 1 dos teleósteos com um valor médio de 516 (509-524, n=6) para o subgrupo 1A e com um valor médio de 520 (variando entre 517 e 523, n=7) para o subgrupo 1B. As maiores sequências do grupo 1 resultam de um acréscimo de 16-20 aminoácidos extra no N-terminal que tinham uma terminação M-A-(G,A) no subgrupo 1A e M-D-(L,R)-I no subgrupo 1B. Adicionalmente, vários aminoácidos podem ser identificados como sendo unicamente conservados dentro de cada grupo e subgrupo, não aparecendo na mesma posição em nenhuma sequência que não pertença ao grupo em que são conservados. Por esta razão, estes aminoácidos fornecem identificadores únicos aos grupos que os contêm.

3.3.4 EXPRESSÃO DO mRNA DE P450 AROMATASE NOS TECIDOS DA TILÁPIA

Inicialmente, a expressão dos genes *Cyp19A* e *Cyp19B* ao nível do mRNA, foi confirmada por *Northern blot* realizado a mRNA de cérebro e de ovário de *O. mossambicus*. Este *Northern blot* serviu ainda para confirmar a especificidade de cada uma das sondas utilizadas (Figura 24) na detecção de transcritos nos diferentes tecidos e no desenvolvimento ontogénico para a expressão dos dois genes. Os mesmos clones foram ainda utilizados no Capítulo 4 para a produção de ribossondas para a análise efectuada por hibridação *in situ*.

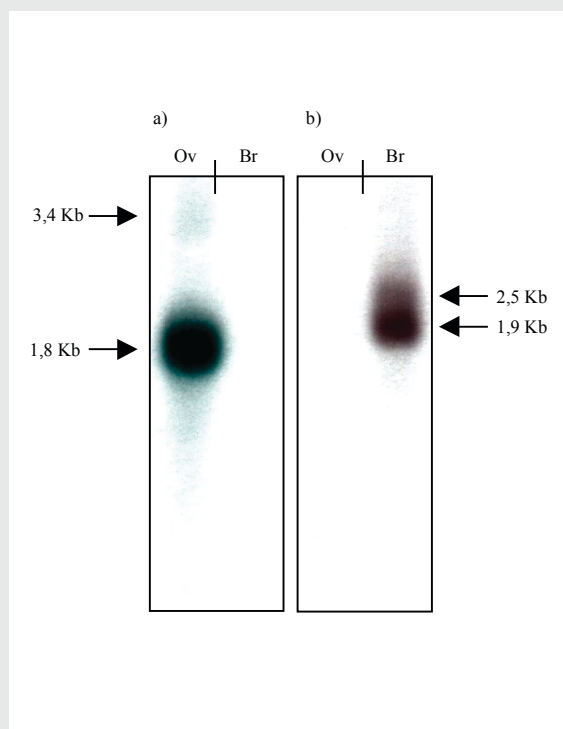


Figura 24 – Análise por *Northern blot* efectuada a mRNA de ovário (Ov) e cérebro (Br) de *O. mossambicus*: a) Hibridação com uma sonda composta pelo clone da aromatase do ovário, correspondendo a uma sequência de cDNA com 1783pb; b) Hibridação com um fragmento de restrição extraído do clone F3Br3 utilizando para o efeito as enzimas EcoR I e Xho I com aproximadamente 1000pb. Quando a hibridação foi feita com o clone do ovário, nenhum sinal é detectado ao nível do mRNA extraído do cérebro. O procedimento inverso foi também verificado para o mRNA do ovário quando usado o clone do cérebro como sonda. Foram detectados dois transcritos para a aromatase do cérebro (1.9Kb and 2.5Kb) e do ovário (1.8Kb and 3.4Kb) quando usando as sondas respectivas

A sonda 3OV1 revelou a existência de dois transcritos no mRNA extraído do ovário de *O. mossambicus*, com aproximadamente 1.8 e 3.4Kb, sendo o primeiro de dimensão coincidente com o clone 3OV1 (correspondente à aromatase do ovário) aqui descrito. A sonda ArmBr1 obtida a partir do clone F3BR3, usada após o stripping da membrana, apenas o mRNA extraído do cérebro revelou a presença de dois outros transcritos com aproximadamente 1.9 e 2,5Kb de comprimento. O clone F3BR3 correspondente à aromatase do cérebro aqui descrito apresenta um tamanho inferior a qualquer um dos

dois transcritos encontrados para o tecido do cérebro, confirmando a probabilidade de truncagem deste clone na sua extremidade 5'.

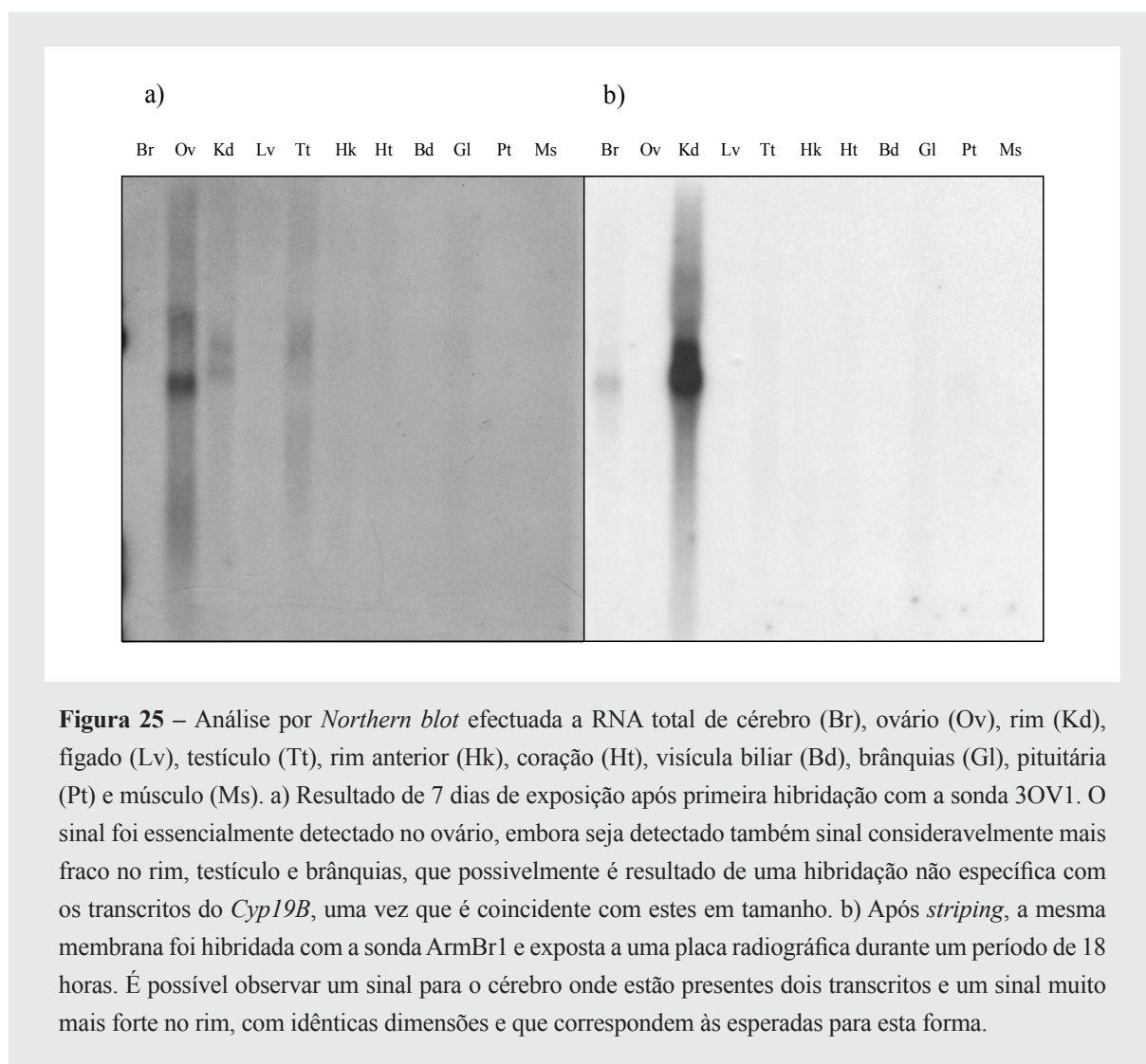


Figura 25 – Análise por *Northern blot* efectuada a RNA total de cérebro (Br), ovário (Ov), rim (Kd), fígado (Lv), testículo (Tt), rim anterior (Hk), coração (Ht), visícula biliar (Bd), brânquias (Gl), pituitária (Pt) e músculo (Ms). a) Resultado de 7 dias de exposição após primeira hibridação com a sonda 3OV1. O sinal foi essencialmente detectado no ovário, embora seja detectado também sinal consideravelmente mais fraco no rim, testículo e brânquias, que possivelmente é resultado de uma hibridação não específica com os transcritos do *Cyp19B*, uma vez que é coincidente com estes em tamanho. b) Após *stripping*, a mesma membrana foi hibridada com a sonda ArmBr1 e exposta a uma placa radiográfica durante um período de 18 horas. É possível observar um sinal para o cérebro onde estão presentes dois transcritos e um sinal muito mais forte no rim, com idênticas dimensões e que correspondem às esperadas para esta forma.

A análise por *Northern blot* foi alargada a outros tecidos utilizando-se desta vez RNA total. Esta análise confirmou a presença de transcritos múltiplos dos dois clones em diferentes tecidos. Dois transcritos de *Cyp19A*, com as mesmas dimensões detectadas anteriormente (1,8 e 3,4 Kb) foram detectados essencialmente no ovário, e com menor intensidade no rim, nos testículos e brânquias (Figura 26). Estes transcritos mais fracos detectados nestes tecidos podem ainda ser resultado de uma hibridação cruzada com o clone do cérebro que apresenta o mesmo tamanho. Para o *Cyp19B* foram também detectados dois transcritos com idênticos tamanhos aos encontrados no *Northern* anterior (1,9 e 2,5Kb), sendo estes

essencialmente expressos no cérebro e no rim, sendo o sinal obtido para o rim uma ordem de magnitude superior ao detectado no cérebro (Figura 26).

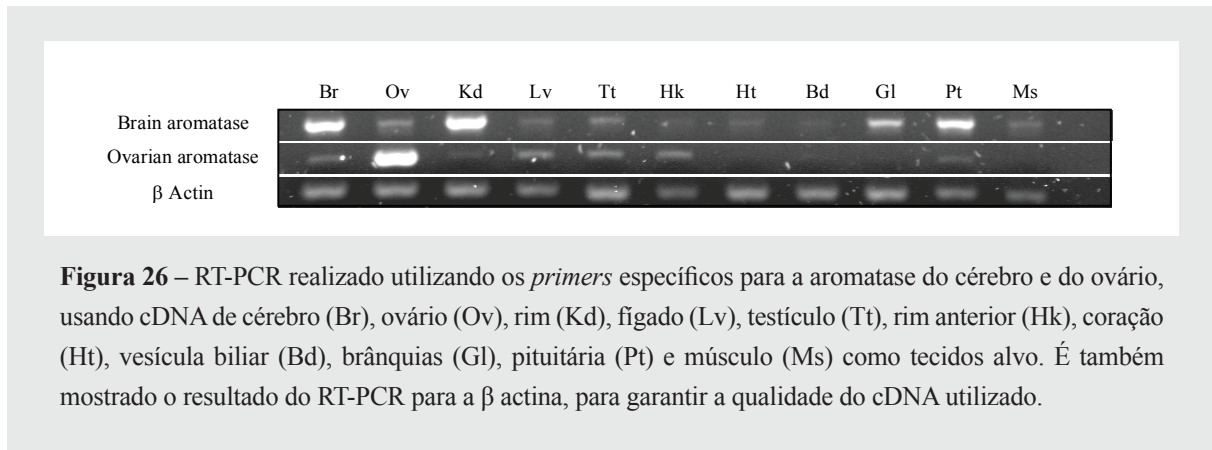


Figura 26 – RT-PCR realizado utilizando os *primers* específicos para a aromatase do cérebro e do ovário, usando cDNA de cérebro (Br), ovário (Ov), rim (Kd), fígado (Lv), testículo (Tt), rim anterior (Hk), coração (Ht), vesícula biliar (Bd), brânquias (Gl), pituitária (Pt) e músculo (Ms) como tecidos alvo. É também mostrado o resultado do RT-PCR para a β actina, para garantir a qualidade do cDNA utilizado.

Foi ainda efectuada uma análise por RT-PCR e por *Southern blot* com o objectivo de confirmar e estender os resultados do *Northern*, já que são técnicas mais sensíveis. Este teste foi efectuada para ambos os genes e comparado com o gene da β -actina com o objectivo de despistar possíveis diferenças na concentração inicial de cDNA utilizado. Desta forma foi possível avaliar qualitativamente quais os tecidos em que os sinais são expressos com maior intensidade, por visualização em electroforese num gel de agarose. A expressão dos dois genes analisada por RT-PCR e por *Southern blot* permitiu adicionalmente detectar sinal do gene *Cyp19A* no fígado, rim anterior, vesícula biliar, pituitária e músculo, mantendo o sinal mais significativo no ovário. Recorrendo à utilização das mesmas técnicas, o gene *Cyp19B* foi ainda detectado nas brânquias e na pituitária de forma muito significativa, além dos sinais referidos anteriormente, revelando um sinal muito forte no cérebro e no rim. A hibridação com a sonda do cérebro, embora com sinais muito fracos apenas falhou na detecção de transcritos no fígado e vesícula biliar.

As diferenças nos resultados obtidos por *Northern* e por RT-PCR foram provavelmente devidos à fraca expressão de alguns transcritos, que por esta razão não foram detectados por *Northern blot*. Os resultados do RT-PCR foram confirmados por *Southern blot* (dados não apresentados).

3.3.5 EXPRESSÃO DE *CYP19A*, *CYP19B* E RECEPTORES DE ESTROGÉNIO α E β DURANTE O DESENVOLVIMENTO INICIAL

As sequências de ambos os fragmentos de receptores de estrogénios apresentam elevada similaridade com as sequências dos respectivos receptores de *O. niloticus*, presentes no *GeneBank*. As sequências partilham 100% e 99% de homologia respectivamente com os receptores de estrogénios α e β de *O. niloticus*. Embora neste trabalho tenham sido utilizadas sondas específicas, actualmente estão já disponíveis as sequências completas para ambos os receptores de estrogénios para a tilápia moçambicana com as seguintes referências: ER α – AM284390; ER β – AM284391

Após extraído RNA total a conjuntos de 3 larvas de igual idade, a idades compreendidas entre 1 e 31 dias após fertilização, foi feita a análise da expressão dos quatro genes para as diferentes idades recolhidas. A Figura 27A apresenta os resultados obtidos por RT-PCR e visualizados por electroforese num gel de agarose para ambas as formas de P450 aromatase detectadas no cérebro e ovário, bem como para ambos os receptores de estrogénios ao longo do primeiro mês de vida de *O. mossambicus*. O mesmo procedimento foi repetido analisando larvas individualmente em diferentes fases do ciclo (Figura 27B).

O PCR ao cDNA da β -actina serviu como referência para mostrar que a quantidade de RNA era semelhante entre amostras. O *Cyp19A* foi detectado no agrupamento de larvas com idades superiores a 1 dpf, enquanto que o *Cyp19B* apenas foi detectado a partir do dia 9. Ambos os genes revelaram uma expressão consistente pelo menos até ao dia 31 após a fertilização. Mais ainda, o gene *Cyp19A* parece apresentar uma expressão consideravelmente mais forte durante o primeiro mês de vida, enquanto que o *Cyp19B* revelou um sinal mais discreto. O ER α foi detectado a partir de 3 dpf exibindo um sinal bastante intenso e constante até dia 31. Por outro lado, para o ER β , foi revelado um sinal muito mais fraco tendo sido detectado de forma irregular e apenas nos dias 13, 17, 25, 27 e 31. Estes resultados parecem ser coerentes com a análise individual das larvas, em que mais uma vez a expressão do ER β parece inconstante e a expressão dos restantes genes se mostra relativamente regular, embora com diferenças individuais nos restantes genes em idades superiores a 10dpf, com excepção para o gene *Cyp19A* que se expressa de forma mais clara a partir do primeiro dia e para o gene *Cyp19B* pôde também se redetectado no dia 1 ao contrário do tratamento anterior (Figura 27B).

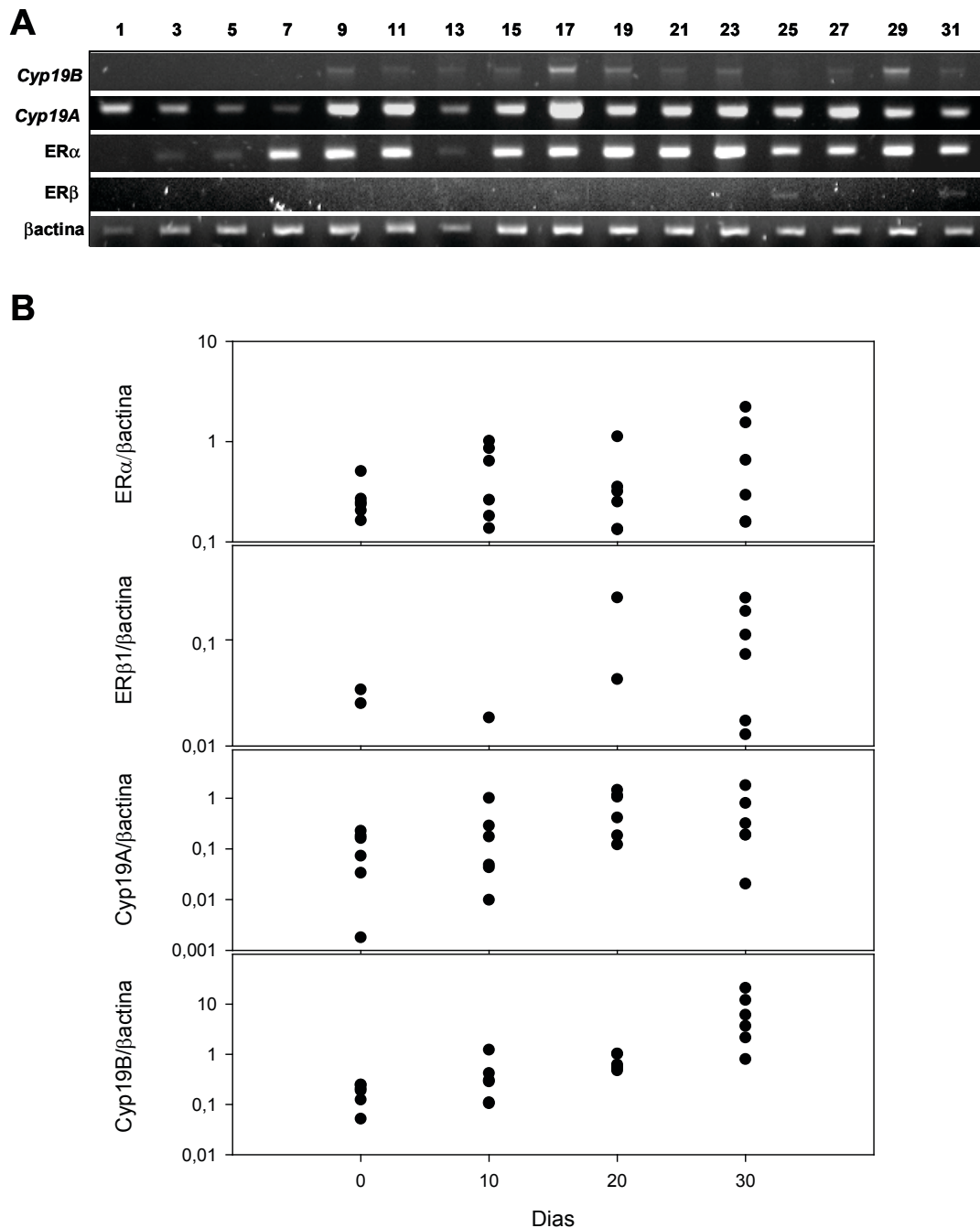


Figura 27 – Análise por RT-PCR de ambos os genes da aromatase, receptores de estrogénios α e receptor de estrogénios β , durante o primeiro mês de vida de *O. mossambicus*. A expressão da β -actina foi utilizada como referência. A) Gel de electroforese com o resultado da extracção de mRNA de 3 larvas. *Cyp19B* só foi detectado a partir do dia 9 após a fertilização, após o que é detectado até dia 31, embora com um sinal relativamente fraco. O transcrito do *Cyp19A* foi detectado desde o dia 1 e apresentou-se relativamente constante durante todo o ciclo. A expressão da forma do ovário é bastante semelhante à do receptor de estrogénios α , que surgiu a partir do dia 3 e se manteve constante até final do ciclo. A forma β do receptor de estrogénios apresentou um padrão de expressão irregular, tendo apenas sido detectado desde o dia 13 com um sinal bastante fraco. B) Gráfico resultante da análise de larvas individuais com os valores ponderados pelos obtidos para a β -actina. Neste tratamento, o gene *Cyp19B* pode ser detectado a partir do primeiro dia do desenvolvimento como havia já sido determinado no tratamento anterior para o *Cyp19A*.

3.3.6 EXPRESSÃO DE *CYP19A*, *CYP19B* E RECEPTORES DE ESTROGÉNIO α E β DURANTE O CICLO REPRODUCTIVO

O mRNA para *Cyp19A* expressou-se praticamente só no ovário (Figura 28) e para *Cyp19B* (Figura 28) só no cérebro a níveis mais ou menos constantes durante o ciclo ovárico (amplitude de GSI 1.8%-6.5%). Embora não seja apresentado na figura referida, foi ainda testada a expressão dos mRNA para o *Cyp19A* e para o *Cyp19B* respectivamente para o cérebro e para o ovário, sem que tivesse sido obtido qualquer sinal. O ER α teve expressão variável no ovário e no cérebro, mas sem uma tendência clara com o crescimento do ovário (Figura 29). O ER β 1 esteve ausente no cérebro, mas os níveis no ovário não mostraram tendência clara (Figura 29).

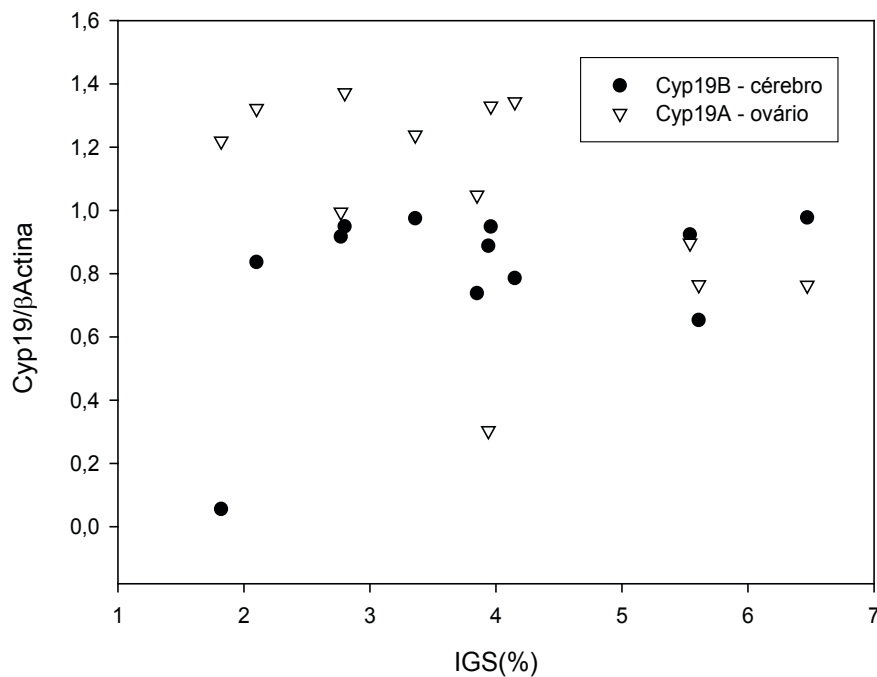


Figura 28 – Análise por RT-PCR de *Cyp19A* e *Cyp19B* no ovário e cérebro, respectivamente durante o ciclo do ovário. Não foram encontradas quaisquer expressões para *Cyp19A* e *Cyp19B* no cérebro e no ovário, respectivamente. A expressão dos genes alvo é feita em relação a β -actina. O IGS é o índice gonadossomático.

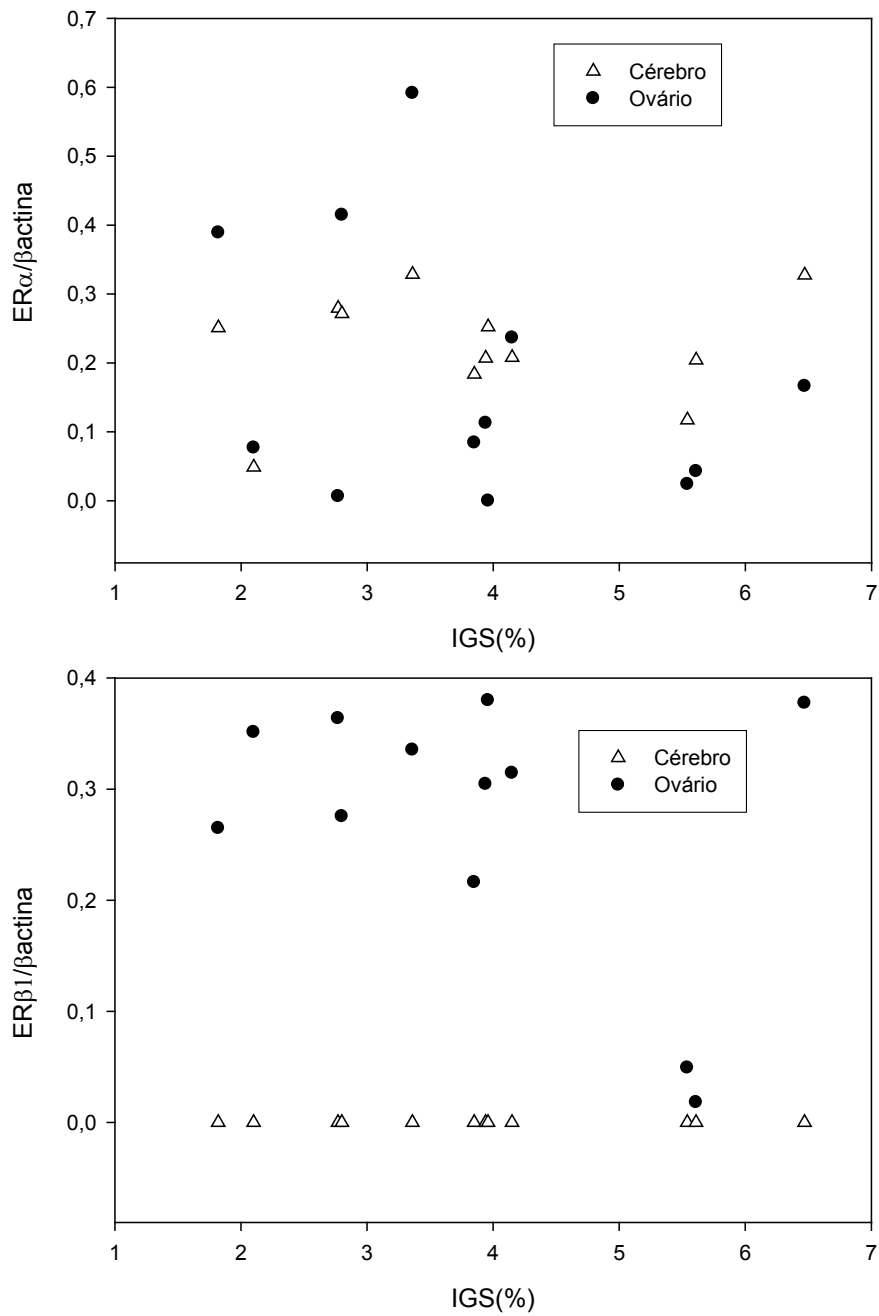


Figura 29 – Análise por RT-PCR de ER α e ER β_1 no ovário e cérebro durante o ciclo do ovário. A expressão dos genes alvo é feita em relação a β -actina. O IGS é o índice gonadossomático.

3.4 DISCUSSÃO

Foram isolados dois fragmentos de cDNA a partir da tilápia moçambicana correspondentes a dois genes *Cyp19*, um com expressão predominante no ovário (*Cyp19A*) e o outro com expressão predominante no cérebro e no rim (*Cyp19B*). Este resultado é consistente com observações de estudos recentes (González & Piferrer, 2002; Orlando *et al.*, 2002; Ijiri *et al.*, 2003), sugerindo que a duplicação do gene *Cyp19* pode ser uma característica geral subjacente aos teleósteos e não apenas dos ciprinidiformes, como inicialmente sugerido (Tchoudakova & Callard, 1998). A relativamente baixa homologia entre as duas sequências confirma uma divergência ancestral. Permanece sob discussão se este facto foi resultado de uma duplicação genómica total precoce na filogenia, anterior à radiação dos teleósteos, e ausente nos peixes cartilagíneos, como sugerido pela análise dos clades *Hox* do peixe zebra (Amores *et al.*, 1998; Meyer & Schartl, 1999), ou a partir de uma duplicação cromossómica (Wang & Gu, 2000; Robinson-Rechavi *et al.*, 2001). No entanto, a análise recente do genoma do Fugo (*Takifugu rubripes*) e do peixe zebra, favorecem fortemente hipótese da duplicação completa do genoma (Jaillon *et al.*, 2004; Vandepoele *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 2005).

A análise da sequência de aminoácidos dos cDNAs traduzidos, demonstrou que as variações se estendem ao longo da estrutura primária da P450arom, e que, com excepção na região terminal, foi mantido um elevado grau de conservação nas características físico-químicas dos aminoácidos, o que sugere que ambas as formas sejam igualmente funcionais, o que está de acordo com o que foi demonstrado para duas proteínas homólogas em peixe zebra (Tong *et al.*, 2001b). Adicionalmente, características específicas da estrutura primária foram detectadas para as duas formas de P450arom. Isto inclui uma região C-terminal mais longa para a P450arom do ovário e a existência de aminoácidos únicos, o que pode influenciar as diferenças na constante de inibição de vários inibidores da aromatase entre as duas isoformas do peixe vermelho (Zhao *et al.*, 2001). De outro modo, não parece haver diferenças na actividade específica entre elas (Tong *et al.*, 2001b; Zhao *et al.*, 2001), o que parece indicar que as diferenças entre as actividades das aromatases do cérebro e do ovário que foram já descritas em peixes, devem resultar de diferenças ao nível da expressão do mRNA (Pasmanik & Callard, 1988; Villeneuve *et al.*, 2006). Mais ainda, o cérebro

dos peixes tem uma magnitude na actividade da aromatase que chega a ser 2-3 ordens de grandeza superior à verificada no cérebro dos mamíferos (Callard *et al.*, 2001). Este facto é, pelo menos em parte, explicado pela mais elevada constante de Michaelis-Menten (K_m) da enzima dos mamíferos (Zhao *et al.*, 2001). Uma explicação para os elevados níveis de aromatase no cérebro dos peixes pode ser que os elevados níveis de estrogénios podem ser necessários para a regulação das gonadotrofinas (Tchoudakova *et al.*, 2001) e/ou para a neurogénese, neuroplasticidade e potencial regenerativo do sistema nervoso central (SNC) (Forlano *et al.*, 2001; Pellegrini *et al.*, 2005), um processo que é contínuo em peixes e que será favorecido pela expressão constitutiva da P450aromB (Callard *et al.*, 2001). Isto poderá também explicar a transferência por via materna do mRNA para o *Cyp19* (Sawyer *et al.*, 2006) e a sua expressão através da embriogénese na tilápia e no peixe zebra (Sawyer *et al.*, 2006). Tendo em conta a expressão da enzima em diferentes tecidos, é possível que a sua função desempenhe um papel mais geral no desenvolvimento.

Os nossos resultados obtidos por RT-PCR, mostram que o ER α é expresso a partir do dia 3 do desenvolvimento embrionário. O ER β é apenas expresso por volta do dia 13, apresentando um sinal fraco e irregular, o que sugere que a sinalização produzida pelos estrogénios nos estádios iniciais de desenvolvimento ocorre por acção do ER α . Contudo, é possível que baixos níveis de expressão estejam presentes para os genes ER β , uma vez que em peixe zebra ambos os receptores (ER α e ER β) são expressos algumas horas após a fertilização (Bardet *et al.*, 2002) e pelo menos a partir do dia 5 na carpa (*Pimephales promelas*) (Filby & Tyler, 2005).

Foram identificados dois transcritos para cada uma das isoformas do *Cyp19* na tilápia moçambicana, ao contrário do que havia sido demonstrado para o labrídeo *Halichoeres tenuispinis* (Choi *et al.*, 2005) e para o robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Dalla Valle *et al.*, 2002a), com excepção para um transcrito de maiores dimensões (2,6kb) para o gene *Cyp19B* em *H. tenuispinis*. Contudo, na truta arco-íris, o tamanho dos transcritos foi muito maior do que o por nós determinado para o transcrito mais expressivo na tilápia, com 2,6kb para o *Cyp19A* e 3,8Kb para o *Cyp19B* (Dalla Valle *et al.*, 2002b). Permanece ainda por determinar se existe uma significância funcional nestas diferenças ou se está

relacionado com diferenças taxonómicas. Até ao presente, não foram identificadas formas excisadas nos genes *Cyp19* em nenhum teleósteo, ao contrário do que acontece nos vertebrados superiores (Choi *et al.*, 1996; Furbass *et al.*, 1997; Levallet *et al.*, 1998a).

Na tilápia moçambicana, ambos os genes foram expressos numa grande diversidade de tecidos, com alguma sobreposição das duas formas em alguns deles, embora o *Cyp19A* tenha apenas sido altamente expresso na gónada. A mais alta expressão para o *Cyp19B* foi encontrada no cérebro, no rim, na pituitária e nas brânquias. Este padrão é muito semelhante ao que foi encontrado noutros teleósteos (Callard *et al.*, 2001; Chiang *et al.*, 2001a; Tong *et al.*, 2001a; Dalla Valle *et al.*, 2002b; Goto-Kazeto *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005b; Greytak *et al.*, 2005; Sawyer *et al.*, 2006) realçando a expressão conservada e as funções fundamentais em relação a diferentes tecidos. Tem sido sugerido que a sobreposição da expressão dos dois genes, indicando não especificidade num tecido particular, pode ser funcionalmente importante mas provavelmente com diferentes funções para as duas isoformas no mesmo tecido (Callard *et al.*, 2001).

Uma das funções documentadas da aromatase é a regulação da actividade comportamental em aves e mamíferos. Nos peixes existem também evidências que suportam a existência de um cérebro sexualmente dimórfico, com uma mais elevada actividade da aromatase nos machos do que nas fêmeas (Gelinas & Callard, 1993), sugerindo que esta enzima tenha também um papel importante na diferenciação e na activação do comportamento sexual nos peixes (Hallgren *et al.*, 2006). No entanto, de forma diferente do que se conhece nos vertebrados superiores, existem evidências experimentais que suportam uma grande plasticidade do cérebro dos teleósteos, em que os comportamentos podem ser influenciados por esteróides durante a idade adulta (Stacey & Kobayashi, 1996). Embora o comportamento das fêmeas de tilápia seja menos conspícuo do que os machos da mesma espécie, intuitivamente esperávamos diferenças significativas para o gene *Cyp19A* no ovário em relação ao crescimento da gónada. Contudo, não foi encontrada qualquer correlação entre o IGS e a expressão do mRNA do gene *Cyp19A* ou *Cyp19B* no cérebro ou na gónada. No peixe-gato (*Ictalurus punctatus*), que tem um ciclo anual longo, não foi encontrada uma correlação significativa entre o IGS e a expressão do gene *Cyp19A*

mas existem picos significativamente elevados no início da recrudescência do ovário e a meio da vitelogenese (Sampath Kumar *et al.*, 2000). Um outro relato, embora não tão detalhado, demonstrou picos elevados de expressão de mRNA do gene *Cyp19A* no ovário de *Fundulus heteroclitus* reprodutoramente activos (Greytak *et al.*, 2005) e no ciprinídeo (*Pimephales promelas*) (Villeneuve *et al.*, 2006) em comparação com indivíduos não reprodutores e imaturos. A falta de relação significativa entre o IGS e a expressão do gene *Cyp19A* neste estudo pode indicar que a regulação da produção de estrogénios durante a vitelogenese ocorre principalmente ao nível da proteína. Nos poucos estudos que utilizaram peixes como modelos, que compararam mRNA do *Cyp19B* em fêmeas reprodutoras e não reprodutoras, este expressou-se geralmente de forma mais elevada em fêmeas reprodutoras (Forlano & Bass, 2005; Greytak *et al.*, 2005; Villeneuve *et al.*, 2006). Observações semelhantes foram feitas para proteínas (Gelinas *et al.*, 1998; Kishida & Callard, 2001; Gonzalez & Piferrer, 2003; Jeng *et al.*, 2005). Apenas o *Cyp19B* apresenta elementos responsivos a estrogénios na sua região promotora e parte das diferenças entre a regulação dos dois genes pode ser explicada por um *loop* regulador de que o estrogénios fazem parte, e que está presente no cérebro e não na gónada (Tchoudakova *et al.*, 2001).

Em conclusão, as isoformas do cérebro e do ovário do gene *cyp19* são expressas precocemente após a fertilização de forma concertada com o ER α , indicando uma função importante para estas hormonas nos estádios iniciais do seu desenvolvimento. Embora exista uma distribuição alargada em diferentes tecidos, bem como alguma sobreposição das duas isoformas em alguns deles, a isoforma do ovário é maioritariamente expressa no ovário e a isoforma do cérebro é sobretudo expressa no cérebro e no rim. Como os dois genes são regulados de formas diferentes, é provável que tenham evoluído para terem diferentes funções nos diferentes tecidos, de modo equivalente ao que acontece com as formas que ocorrem nos vertebrados superiores por *splicing* alternativo. No entanto, como as características bioquímicas de ambas as formas são equivalentes, a identificação dos factores que promovem a divergência selectiva dos dois genes deverá fornecer indicações em relação às forças que actuam na evolução do genoma. Este trabalho servirá como base para estudos futuros sobre as funções da aromatase nos comportamentos sexuais e agonísticos na tilápia moçambicana.

CAPÍTULO IV

DISTRIBUIÇÃO DOS TRANSCRITOS DA AROMATASE NO CÉREBRO DA TILÁPIA

4.1 INTRODUÇÃO

Os diferentes tipos de unidades comportamentais que podem ser encontrados em cada espécie evoluíram no contexto de adaptações a determinados estilos de vida. Pelo menos alguns tipos de comportamentos, como os agonísticos e os reprodutores, são regulados por factores endócrinos. Embora a ligação entre hormonas e comportamento se estenda aos diferentes grupos de hormonas, são as hormonas esteróides produzidas nas gónadas que assumem um papel central neste processo. Nos Vertebrados em geral e também nos peixes, os androgénios assumem um papel importante na mediação quer dos comportamentos reprodutores, quer nos comportamentos agonísticos. A hipótese do desafio (Wingfield *et al.*, 1990) determina que a produção de androgénios num indivíduo responde às interacções sociais em que este participa. À luz desta teoria têm sido desenvolvidos diversos trabalhos, quer levantando algumas objecções à sua generalização a todos os vertebrados (Muehlenbein *et al.*, 2004) quer também no sentido de a alargar aos teleósteos (exemplos em Hirschenhauser *et al.*, 2004; Ros *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2002). Neste último grupo, foi já determinada a existência de uma modelação social dos androgénios em peixes (Oliveira *et al.*, 2002), bem como o facto de apenas a observação de um confronto agonístico ser suficiente para aumentar os níveis de androgénios em machos espectadores (Oliveira *et al.*, 2001c). Por outro lado, foi também determinado que a quantidade de androgénios em circulação no plasma parece prever a posição hierárquica que os indivíduos ocupam num grupo, o que em conjunto com o referido anteriormente, sugere uma relação biunívoca entre as hormonas e o comportamento (Oliveira *et al.*, 2002).

Embora os androgénios sejam importantes na activação dos comportamentos sociais, nos quais os sexuais também podem ser incluídos, a sua total expressão implica a aromatização nos seus estrogénios correspondentes, como acontece com a testosterona e a androstenediona, respectivamente convertidas em estradiol e estrona. Esta reacção é catalizada pela P450-aromatase. Nos peixes, esta enzima é transcrita a partir de dois genes diferentes (*Cyp19A* e *Cyp19B*), tendo a primeira forma sido inicialmente identificada a partir do ovário e a segunda a partir do cérebro em *C. auratus* (Callard & Tchoudakova, 1997; Gelinas *et al.*, 1998).

O controlo da actividade da aromatase tem sido implicado como regulador de diferentes fases do desenvolvimento dos vertebrados. Primeiro na diferenciação sexual do cérebro durante a embriogénese, organizando o sistema nervoso central de forma sexualmente dimórfica e depois nos adultos, activando os comportamentos sexuais dos machos através da aromatização central de androgénios em núcleos específicos do cérebro, como é o caso da área pré-óptica do hipotálamo (Balthazart *et al.*, 1996b; Hutchison *et al.*, 1995). A distribuição da aromatase encontra-se já bastante estudada nos roedores e nas aves, onde as principais regiões cerebrais expressam mRNA do *Cyp19* (exemplos em Balthazart *et al.*, 1996b; Shen *et al.*, 1995). Nos vertebrados superiores, as zonas que apresentam uma densa expressão da aromatase no cérebro são diversas, mas fundamentalmente as regiões que expressam níveis mais significativos de actividade enzimática são as hipotalâmica e a límbica (Roselli *et al.*, 1985; Roselli *et al.*, 1997; Roselli *et al.*, 1998a). Mais precisamente, as células no cérebro que expressam mRNA para *Cyp19* situam-se no núcleo pré-óptico médio do hipotálamo, no BnST e na região mediana da Amígdala (Panzica *et al.*, 1996; Roselli *et al.*, 1998a).

Embora o papel conferido à aromatase na activação e mediação dos comportamentos sexuais nos machos dos vertebrados superiores seja reconhecido, em peixes o processo não é ainda bem conhecido. No entanto, os elevados níveis de actividade da aromatase já detectados no cérebro de teleósteos (Pasmanik & Callard, 1985; Gelinas & Callard, 1993), parecem indicar que também nos peixes esta enzima deve desempenhar um papel importante na mediação do comportamento sexual masculino.

Ainda nos peixes, a expressão da aromatase foi já referida em diferentes núcleos do hipotálamo como a área pré-óptica, o núcleo periventricular, nas regiões medianas e ventrais do telencéfalo e nos bolbos olfactivos (Gelinas & Callard, 1997; Chiang *et al.*, 2001a; Forlano *et al.*, 2001). Dentro do próprio cérebro, a localização da aromatase foi já identificada nas regiões terminais dos axónios nos mamíferos (Naftolin *et al.*, 1996), enquanto que nos peixes pode ser encontrada nos neurónios (Gelinas & Callard, 1997) e nas células da glia (Forlano *et al.*, 2001).

A tilápia, *O. mossambicus*, tem sido muito utilizada em estudos comportamentais. Por

um lado, esta espécie tem um dimorfismo sexual acentuado, que é identificado pela forte coloração do macho quando sexualmente activo. Por outro lado, apresenta um elaborado ritual de acasalamento quer por parte do macho, quer por parte da fêmea (descrição em Oliveira, 1995). Quando existem condições favoráveis, o macho escava um ninho no substrato que serve para receber as fêmeas sexualmente activas. Uma vez depositados no ninho, os ovos são recolhidos pela fêmea e todo o processo de incubação é feito na sua boca até que as larvas estejam capazes de se alimentarem autonomamente. A espécie apresenta ainda a vantagem prática de ser um reprodutor contínuo, o que significa que, se as condições forem favoráveis, cada fêmea pode reproduzir-se várias vezes num mesmo ano (ver dimensão do ciclo no capítulo 2). Assim, na continuação dos estudos descritos no capítulo 3, foi estudada a presença e localização da aromatase no cérebro de *O. mossambicus*. Foi também estabelecida e comparada a distribuição e abundância dos transcritos para os dois genes *Cyp19* entre machos e fêmeas. Por último, pretendeu-se ainda estabelecer uma relação entre esta distribuição e os núcleos que regulam o comportamento.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os principais métodos descritos neste capítulo estão relacionados com a manutenção e amostragem dos peixes, com a preparação do material para análise através de hibridação *in situ* e a preparação das ribossondas. Para localizar as duas formas da aromatase no cérebro de animais adultos foram produzidas duas ribossondas específicas de cada uma das formas, a de cérebro (F3BR3) e a de ovário (3OV1). As ribossondas foram hibridadas com secções adjacentes dos cérebros utilizados, para determinar se a expressão de cada gene ocorre em zonas idênticas. Os cérebros foram cortados segundo um plano sagital e cada ribossonda foi inicialmente hibridada com cortes da região mediana do cérebro de um macho e de uma fêmea. A identificação das diferentes regiões e grupos celulares descrita nos resultados deste capítulo foi feita com base no atlas do cérebro de peixe zebra (Wullimann *et al.*, 1996). Toda a nomenclatura e abreviaturas utilizadas neste capítulo, seguiram as utilizadas na referida obra.

4.2.1 RECOLHA, FIXAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Todos os animais utilizados encontravam-se sexualmente maduros e foram mantidos com descrito na secção 2.2.1. Os animais adultos foram sacrificados com uma dose letal do anestésico 2-phenoxyethanol (0.5%, v/v; Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha), seguida por decapitação. Foram recolhidos cérebros com a pituitária associada de quatro adultos sexualmente maduros de cada sexo e directamente colocados em fixador de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) a 4%, preparado imediatamente antes da utilização, com água tratada com DEPC e arrefecido a 4°C antes da utilização. Os restantes tecidos foram imediatamente congelados em azoto líquido e posteriormente transferidos para uma arca a -80°C, até posterior utilização para extracção de RNA total.

O passo que envolve a fixação dos tecidos é de crucial importância e tem como objectivo promover o *cross-linking* das proteínas no tecido, reduzindo ao mínimo a solubilidade das proteínas e inactivando as enzimas presentes no material biológico. Este processo permite conservar a estrutura típica do tecido em geral, conservando também a conformação e o posicionamento das proteínas, dos ácidos nucleicos em geral e do RNA em particular, permitindo simultaneamente a penetração das sondas e dos anticorpos que eventualmente venham a ser utilizados durante o processo subsequente. Assim, a fixação correcta dos materiais biológicos reveste-se de importância vital para o sucesso da técnica de hibridação *in situ*.

A fixação ocorreu a 4°C, durante a noite e, após este período, os tecidos foram lavados duas vezes em PTW (anexo I) durante 15 minutos. Posteriormente, os tecidos foram desidratados através de uma sequência de soluções de metanol/PTW. Depois de uma lavagem rápida em metanol, todas as amostras foram armazenadas em metanol 100%, a 4°C, até serem processadas (protocolo detalhado descrito na Tabela 6).

Tabela 6 – Processo de fixação dos tecidos e consequente tratamento das amostras.**TECIDOS**

- Peixes apanhados de tanques diferentes e sacrificados de imediato com uma dose letal de anestesia
- Recolha das amostras em condições de esterilidade (material autoclavado e lavado com água tratada com DEPC) para dentro de uma solução de PFA 4% em água DEPC.
- Fixação em PFA 4% durante 18h a 4°C.
- Lavagem em PTW durante 15min. (2×).
- Lavagem em metanol: PTW (30%:70%) durante 15min.
- Lavagem em metanol: PTW (50%:50%) durante 15min.
- Lavagem em metanol: PTW (70%:30%) durante 15min.
- Lavagem em metanol absoluto (100%) durante 5min.
- Armazenamento das amostras em metanol absoluto (100%) a 4°C até utilização.

4.2.2 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após a fixação e a desidratação dos tecidos, as amostras foram incluídas em parafina de acordo com o seguinte protocolo:

As amostras, previamente armazenadas em metanol, sofreram uma série de lavagens até à sua inclusão em parafina. O primeiro passo deste processo passa por uma solução de metanol: etanol (1:1), seguida por dois passos consecutivos em etanol absoluto (100%), etanol: xilol (1:1) e de seguida duas lavagens em xilol 100%. Todos estes passos ocorreram à temperatura ambiente e destinam-se a preparar as amostras para a inclusão em parafina tendo cada passo uma duração de trinta minutos. Depois deste processo, as amostras passaram para uma solução de xilol: parafina (1:1 v/v) de baixo ponto de fusão (58°C) durante uma hora, e em seguida foram colocadas, como passo final, em parafina com as mesmas características, também previamente aquecida a 58°C, durante uma hora.

Todas as amostras foram depois incluídas em blocos de parafina e posteriormente seccionadas numa série sequencial de cortes com 11µm de espessura. Como no cérebro

existe uma grande diversidade de zonas com funções e características diferentes, e como adicionalmente se pretendeu visualizar em simultâneo o padrão de expressão das enzimas na pituitária, optou-se por se proceder ao seccionamento segundo um plano sagital. Deste modo, foram preparados cortes sequenciais compreendendo aproximadamente metade do tecido, com o objectivo de conhecer o padrão de expressão dos genes *Cyp19* nas diferentes regiões cerebrais e na pituitária.

Para garantir a total aderência dos cortes às lâminas, estas foram previamente tratadas com poly-L-Lysina (Sigma). Para este processo, as lâminas foram inicialmente lavadas em água ácida (HCl a 0.5%), passadas em água corrente, passagem rápida em água destilada e 20 minutos em poly-L-Lysina (a uma diluição de 1:10 do *stock* original). Após este tratamento, as lâminas foram colocadas numa estufa a 37°C durante 24h antes de serem utilizadas.

4.2.3 COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA

A coloração com hematoxilina e eosina foi utilizada para avaliar a integridade dos tecidos após o processo de montagem em lâminas e ainda para avaliar aspectos morfológicos do próprio tecido. Assim, foi possível caracterizar a organização dos tecidos e desta forma foi ainda possível seleccionar as secções mais apropriadas para o trabalho subsequente. Adicionalmente, nos tecidos animais ocorrem naturalmente depósitos de melanina em algumas regiões. Estes depósitos podem por vezes confundir-se com os sinais específicos provenientes da coloração originadas na hibridação *in situ* e imunohistoquímica. Assim, utilizou-se um conjunto de lâminas, com cortes adjacentes aos utilizados nas técnicas acima referidas, às quais foram feitas colorações com hematoxilina e eosina. Deste modo, foi ainda possível avaliar com segurança quais os sinais positivos.

Como ambos os corantes aqui utilizados são solúveis em água, o processo inicia-se por uma desparafinação (duas lavagens em xilol, 10 e 5 minutos, respectivamente) e por uma hidratação através de uma sequência de lavagens em concentrações decrescentes de etanol (100%, 96% e 70%, cada uma durante 5 minutos), terminando a hidratação em água destilada durante 5 minutos. De seguida as lâminas foram colocadas em hematoxilina

durante 3 minutos e depois foram lavadas em água corrente. No passo seguinte, as lâminas foram colocadas em eosina durante 1 minuto, passando depois por uma breve lavagem em água destilada durante dois minutos, para que os restos do corante fossem eliminados. Os tecidos foram de novo desidratados (70% etanol, 96% etanol, 100% etanol, 5 minutos cada passo) e depois colocados em duas lavagens consecutivas em xilol durante cinco minutos cada, para clarear os tecidos e para os preparar para a montagem em DPX (Sigma) que completa a preparação definitiva.

4.2.4 HIBRIDAÇÃO *IN SITU*

A hibridação *in situ* é uma técnica utilizada para o estudo de padrões de expressão génica (Broadbent & Read, 1999). Esta técnica consiste na utilização de uma sonda de RNA marcada, produzida por transcrição *in vitro* de uma sequência complementar ao mRNA endógeno (Broadbent & Read, 1999).

A hibridação *in situ* foi utilizada com o objectivo de compreender os padrões de expressão do mRNA que codifica para as duas formas da enzima P450 aromatase e para proceder ao mapeamento da sua expressão no cérebro. Para isto, foram preparadas sondas específicas para cada forma, cérebro e ovário, a partir dos transcritos F3BR3 e 3OV1, respectivamente. Procurou-se por um lado confirmar o que já tinha sido verificado por RT-PCR e por *Northern blot*, e por outro, tentou-se identificar de forma mais precisa as principais localizações de síntese para as duas formas da aromatase.

Para a marcação da sonda com origem no transcrito F3BR3 (gene da aromatase isolado a partir de um banco de cDNA de cérebro), foi utilizada digoxigenina (*digoxigenin RNA labelling mix* - Roche) e o processo de visualização foi feito com a utilização de anticorpos conjugados com fosfatase alcalina (Broadbent & Read, 1999), implicando uma revelação com NBT-BCIP. O composto digoxigenina tem origem vegetal, estando apenas presente em plantas do género *Digitalis sp.*, o que reduz bastante a probabilidade da ocorrência de reacção cruzada com tecidos animais. Para a sonda 3OV1 (gene da aromatase isolado a partir do ovário) optou-se pela biotina (*biotin RNA labelling mix* – Roche), cujo anticorpo

(anti-biotina) usado para visualização dos resultados, é conjugado com peroxidase e posteriormente revelado com DAB. A utilização de duas marcações permitiu verificar a co-localização da expressão génica.

4.2.5 ESPECIFICIDADE DAS SONDAS

As sequências molde utilizadas para a produção da sonda correspondem ao transcrito completo de aromatase de cérebro ou aromatase de ovário previamente clonadas no vector pBluescript SK(+/-) (ver capítulo 3 para uma descrição pormenorizada das características dos cDNA). O clone F3BR3 (AF135850 - *GenBank*) apresenta uma sequência com 1755pb e o clone referido como 3OV1 (AF135851 - *GenBank*) apresenta uma sequência de 1783pb. As duas sequências de nucleótidos partilham 57% de homologia entre si.

A especificidade das sondas foi testada por *dotblot*. Nesta técnica é utilizada uma alíquota das minipreps utilizadas na produção das sondas. Cada uma das alíquotas das minipreps foi depositada em duas membranas e em seguida cada membrana foi hibridada com uma das sondas. Após a hibridação das sondas foram aplicados os anticorpos específicos para cada sonda e em seguida revelados conforme descrito na Tabela 7. Neste teste não foi verificada qualquer reacção cruzada entre cada sonda e a miniprep contrária, tendo apenas sido obtido sinal como resultado da hibridação entre cada sonda e a miniprep que esteve na sua origem. Este facto indica que cada sonda apenas detectará o seu transcrito, caso ele esteja presente nos tecidos pesquisados. A linearização das sondas para a transcrição *in vitro* (secção 4.2.5.1) foi feita usando duas endonucleases de restrição *SmaI* e *EcoRI*, respectivamente para os recombinantes F3BR3 e 3OV1 e transcritas recorrendo à T7 RNA polimerase.

4.2.5.1 Transcrição *in vitro*

O mRNA no tecido alvo encontra-se em cadeia simples no sentido *sense* que lhe permite ser traduzido nos ribossomas. Assim, para detectar com a técnica de hibridação *in situ*, a sonda é formada por uma cadeia simples complementar ao mRNA presente no tecido,

Tabela 7 – Protocolo detalhado dos dotblots realizados para confirmação da especificidade das sondas.**DOTBLOTS**

- Utilização de 1µl das minipreps 3OV1 e F3BR3 cada uma em duplicado.
- Desnaturação das minipreps a 95°C durante 5min.
- Colocar no gelo durante 5min.
- Transferir os plasmídeos desnaturados para duas membranas Hybond Nylon. Cada uma das minipreps foi colocada em ambas as membranas.
- Fixar o DNA às membranas por cross-linking, expondo as membranas a luz ultravioleta (5min).
- Secar as membranas ao ar (15min).
- Lavar as membranas em PTW (2× 5min).
- Pré-hibridação em solução de pré-hibridação (30min).
- Hibridação de cada uma das membranas com uma das sondas durante 1:20h a 56°C.
- Lavagem das membranas em 2×SSC (2×3min a 56°C).
- Lavagem das membranas em 1×SSC (3min a 56°C).
- Lavagem com SSC:CHAPS (3min à temperatura ambiente).
- Lavagem com SSC:PTW (3min à temperatura ambiente).
- Lavagem com PTW (3min à temperatura ambiente).
- Reacção de bloqueação com 10×sheep serum; 2% Bloking solution (20min à temperatura ambiente).
- Reacção com os anticorpos específicos na concentração de 1:5000 em BS (30min à temperatura ambiente).
- Lavagem com NaCl:Tris (2× 3min à temperatura ambiente).
- Revelação do sinal em tampão de coloração (15min à temperatura ambiente).

permitindo hibridação entre este e a sonda (sentido *anti-sense*). Só desta forma será possível que ambos os fragmentos possam hibridar um com o outro produzindo uma cadeia dupla de RNA que poderá ser posteriormente detectada pelos anticorpos.

Tabela 8 – protocolo de linearização das sondas.

Linearização da sonda F3BR3	Linearização da sonda 3OV1
DNA 150ng	DNA 150ng
Solução Tampão: Buffer J 10x (Promega)	Solução Tampão: Buffer H 10x (Promega)
SMA I	ECOR I
Incubar durante 1h:30m a 37°C	Incubar durante 1h:30m a 37°C

As sondas de RNA foram produzidas por transcrição *in vitro*, tendo início nos fragmentos específicos de cDNA já referidos, inseridos no vector *pBluescript*, que contém regiões com promotores específicos para T7 RNA polimerase e T3 RNA polimerase. Para produzir RNA *anti-sense*, e devido às características de ambas as sondas, os fragmentos foram cortados apenas numa das extremidades de forma a permanecerem ligados ao vector na região do promotor T7, ficando lineares na extremidade 5' do cDNA (transcrição *run off*). O vector recombinante F3BR3 foi linearizado com *SmaI* e o 3OV1 com *EcoRI*, de acordo com o protocolo indicado na Tabela 8. Após a digestão, o produto da reacção foi purificado como descrito na Tabela 9.

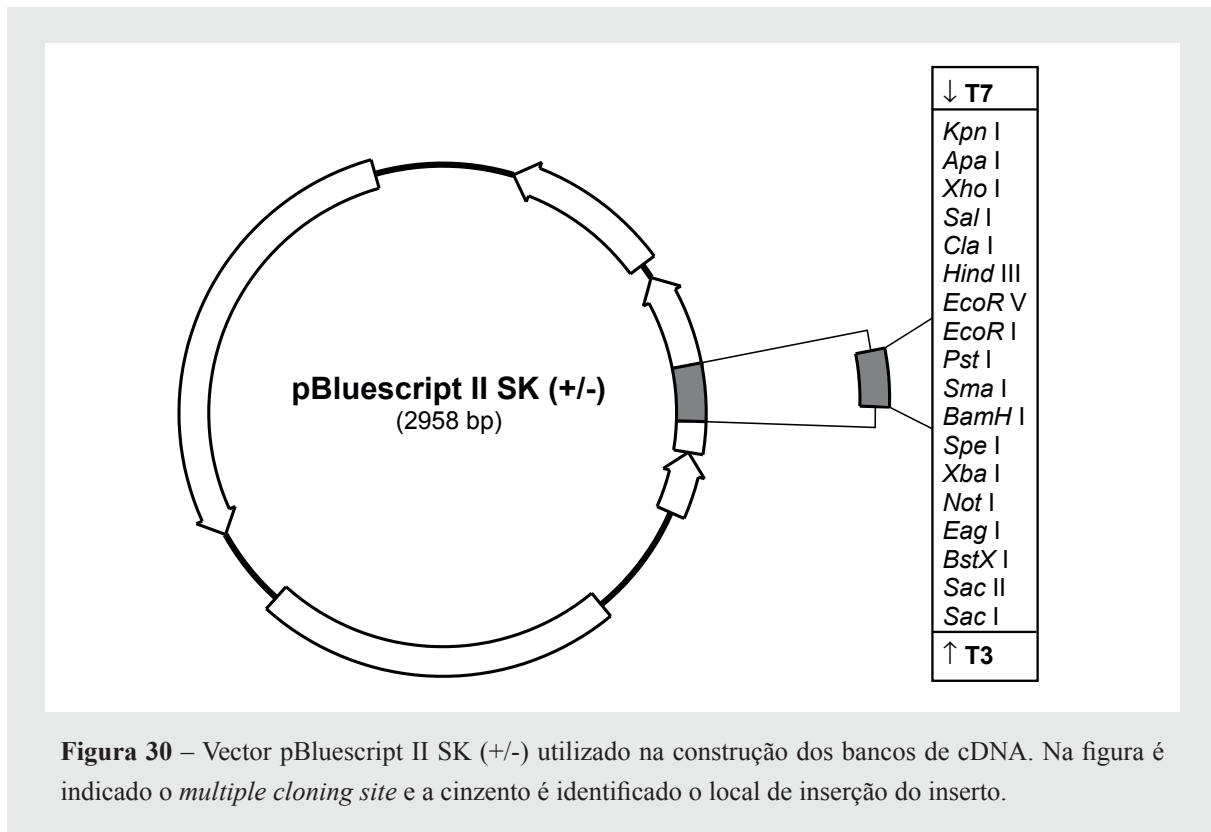
Inicialmente, para confirmar a qualidade e quantidade do DNA usado na transcrição *in vitro*, as reacções foram efectuadas utilizando diversas concentrações de DNA linear e nucleótidos (NTPs) não marcados.

Tabela 9 – Preparação do DNA e transcrição *in vitro* com oligonucleótidos não marcados.**TRANSCRIÇÃO IN VITRO COM OS OLIGONUCLEÓTIDOS DE RNA NÃO MARCADOS**

- Digestão dos clones F3BR3 e 3OV1 com as enzimas de restrição *Sma*I e *Eco*RI, respectivamente, para um volume final de reacção de 20µl, durante 1h:30m a 37°C.
- Após a reacção foram adicionados 100µl de água estéril.
- A reacção foi misturada com 100µl de fenol-cloroformio equilibrado com tampão tris e agitada num vórtex. Permaneceu à temperatura ambiente durante 35min.
- A solução foi centrifugada a 1000rpm durante 10min, à temperatura ambiente, para separação das duas fases. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo estéril.
- O DNA foi precipitado com acetato de sódio (NaAc) a 3M, pH-5.2 (1:10 do volume da reacção) e com etanol gelado a 100% na proporção de 2.5× o volume da solução (aproximadamente 120µl). Decorreu durante 1h a -70°C.
- A solução foi centrifugação a 10000rpm durante 25min
- Após retirar o sobrenadante, o *pellet* foi lavado com etanol gelado 75% 2× e centrifugar de cada vez.
- O *pellet* foi seco ao ar e ressuspenso em 40µl de água ultra pura (Sigma).

- Transcrição com T7 RNA polimerase para um volume final de 20µl: Tampão de transcrição 5× concentrado, 5µl; dTT 100mM, 1µl; NTPmix, 5µl; BSA 10mg/ml, 0.2µl; RNA guard, 0.5µl; DNA (digerido e purificado como descrito anteriormente), 2µl e 4µl para cada uma das duas misturas testadas; T7 RNA polimerase, 1µl; água estéril para um volume final de 20µl.
- Incubação durante 2h a 37°C
- Paragem da reacção no gelo com 2µl de EDTA DEPC 0.2M, durante 2 min.
- Precipitação com cloreto de lítio (LiCl) 4M (1:10) e Etanol 100% gelado (2.5vol) durante 1h a -70°C.
- Centrifugar a 12000rpm a 4°C, 20min.
- Lavagem do *pellet* 2× com etanol gelado a 75% com centrifugação de cada vez.
- Secagem do *pellet*, mantendo-o em gelo, após retirado o sobrenadante.
- Ressuspenção em 25µl de água ultra pura (Sigma).

Após a transcrição inicial feita com NTPs para otimizar as condições de síntese, os nucleótidos foram substituídos por uma mistura de NTPs que inclui UTP marcado com digoxigenina (*digoxigenin RNA labelling mix* - Roche) para a sonda do cérebro (F3BR3) e por biotina (*biotin RNA labelling mix* - Roche) para a sonda do ovário (3OV1).



A síntese foi feita usando a enzima T7-RNA polymerase e incubada durante duas horas a 37°C. Após terminada a reacção, a ribossonda foi precipitada e o *pellet* obtido foi ressuspendido em 25µl de água ultra pura (Sigma) de acordo com o protocolo descrito na Tabela 10.

Tabela 10 – Processo de transcrição *in vitro* com oligonucleótidos marcados com Digoxigenina e Biotina.**Transcrição *in vitro* com nucleótidos marcados com Digoxigenina e Biotina, respectivamente para os clones F3BR3 e 3OV1**

- O processo de purificação de DNA decorreu como descrito na Tabela 9.
- Transcrever com T7 RNA polimerase para um volume final de 20µl: Tampão de transcrição 5× concentrado, 5µl; dTT 100mM, 1µl; *digoxigenin RNA labelling mix* (F3BR3) ou *biotin RNA labelling mix* (3OV1), 2µl; BSA 10mg/ml, 0.2µl; RNA guard, 0.5µl; DNA (digerido e purificado como descrito anteriormente), 2µl para cada uma das duas sondas produzidas; T7 RNA polimerase, 1µl; água estéril para um volume final de 20µl.
- Incubação a 37°C, durante 2h.
- Paragem da reacção no gelo com 2µl de EDTA DEPC 0,2M, durante 2min.
- Precipitação com cloreto de lítio (LiCl) 4M (1:10) e etanol 100% gelado (2.5vol) durante 1h a -70°C.
- Centrifugação a 12000rpm a 4°C, 20min.
- Lavagem do *pellet* 2× com etanol gelado a 75% e repetir a centrifugação anterior.
- Secagem do *pellet* em gelo na *hotte* após o último sobrenadante ter sido retirado.
- Ressuspensão em 25µl de água sigma.

A avaliação da qualidade e da quantidade de ambas as sondas foi feita por electroforese num gel de agarose (Promega) a 0.8% em tampão TBE preparado com água DEPC, a uma corrente constante de 70 volts. Este processo de visualização permite obter uma avaliação qualitativa da concentração de ambas as sondas, essencial na avaliação da quantidade de sonda a usar durante a hibridação. Todo o material utilizado na electroforese foi previamente lavado em 1% SDS durante 20 min, tendo depois sido lavado com água DEPC, para garantir a completa eliminação de possíveis RNases.

4.2.5.2 Protocolo de hibridação

Todas as hibridações *in situ* foram efectuadas em amostras previamente seccionadas e montadas em lâminas. O material utilizado ao longo do processo foi previamente esterilizado por autoclavagem (121°C durante 20 min) e mantido em condições de

esterilidade até ser utilizado. Será descrito o protocolo utilizado para a sonda F3BR3, marcada com digoxigenina e serão ressaltadas todas as alterações de processo quando necessárias para a sonda 3OV1. O protocolo resumido é apresentado na Tabela 11.

Desparafinação e hidratação

Inicialmente as lâminas passaram por xilol para remover na totalidade a parafina em que os tecidos foram incluídos na preparação dos blocos. De seguida, os cortes foram re-hidratados numa série de decrescente concentração de etanol. Para terminar esta fase inicial, as amostras foram lavadas em PTW estéril (anexo I), ficando assim preparadas para a fase seguinte.

No caso da sonda 3OV1, em que o anticorpo se encontrava conjugado com peroxidase, após a lavagem das amostras com etanol a 70%, foi feito um passo adicional com 3% H_2O_2 (30vol), com o objectivo de inactivar a peroxidase endógena presente nos tecidos. As amostras foram depois lavadas em água tratada com DEPC, antes de serem colocadas em PTW e seguirem um processo idêntico ao descrito anteriormente.

Pré-hibridação e Hibridação

Substituiu-se a solução de PTW por solução de hibridação (anexo I) previamente aquecida a 58°C permanecendo as amostras aproximadamente 5h à mesma temperatura numa estufa de hibridação. Este passo denomina-se de pré-hibridação e é crucial para equilibrar as amostras com a solução de hibridação, garantindo uma melhor penetração das sondas para que possa ocorrer a ligação com o mRNA, bem como para evitar interacções não específicas quando a sonda for adicionada.

A hibridação foi feita com solução de hibridação contendo sonda e com as lâminas colocadas na horizontal, ficando os cortes cobertos pelas respectivas soluções dentro de uma caixa estanque. A esta caixa foi adicionada uma toalha de papel embebida em 20×SSC (anexo I), estando o topo da caixa coberto também por uma toalha de papel e por uma tampa de

plástico, evitando desta forma que a evaporação excessiva danificasse ou condicionasse o processo. A caixa fechada foi colocada dentro da estufa de hibridação a 58°C.

A hibridação ocorreu durante a noite a 58°C, tendo sido usada uma diluição de 1µl:200µl da sonda F3BR3 (2µg/ml) em solução de hibridação também pré-aquecida. Para garantir que não havia evaporação da sonda alterando a sua concentração, cada corte foi individualmente coberto por uma tira de parafilme.

Lavagens

Após a hibridação, foram feitas as lavagens de estringência, para remover os restos de sonda não hibridada e para remover as possíveis ligações não específicas.

Inicialmente foi removido o parafilme com 2×SSC (anexo I) previamente aquecido a 58°C. Foram realizadas três lavagens com 2×SSC e duas lavagens adicionais de estringência mais elevada (1×SSC) (todas elas a 58°C).

Em seguida as amostras foram tratadas com RNase A (1mg/ml em 2×SSC), para que fossem removidos possíveis restos de sonda não hibridada ou associada ao tecido através de interações não específicas. Este procedimento não afecta as cadeias duplas de mRNA que se formaram na hibridação (Jowett *et al.*, 1996).

Para remover por completo a RNase A utilizada no passo anterior, as amostras foram lavadas em 2×SSC e 2% CHAPS, seguido de 2×SSC:PTW (1:1). A terminar este conjunto de lavagens, as amostras foram colocadas em PTW.

Reacções de bloqueação e de anticorpo

Esta reacção ocorreu com as lâminas na posição horizontal, estando cada corte coberto com a quantidade de solução necessária e suficiente para que ficassem completamente tapados. Deste modo, todas as secções presentes em cada lâmina estiveram cobertas por solução de bloqueação à qual se adicionou 10% de soro de ovelha (Sigma) (anexo I) durante 3h, antes de ser adicionado o anticorpo *Anti-digoxigenine-FAB-fragments* (Boheringer-

Maneihm), na proporção de 1:200 do *stock* original em solução de bloqueação e 10% de soro de ovelha. A incubação com o anticorpo ocorreu durante 1h:30min.

Para o caso da sonda 3OV1 utilizou-se o anticorpo *Anti-biotin-whole-molecule* conjugado com peroxidase, na proporção de 1:125 do *stock* original em solução de bloqueação e 10% de soro de ovelha. Após este passo, a única diferença que ocorre para a sonda 3OV1 está relacionada com o processo de revelação.

Revelação

Após terminado o período de incubação com anticorpo, as amostras foram lavadas em PTW e depois imersas em tampão de coloração (anexo I). A coloração ocorreu utilizando NBT e BCIP em conjunto, diluídos em tampão de coloração. A reacção ocorreu no escuro e com agitação, durante aproximadamente sete horas. No final do período de revelação, as amostras passaram por uma lavagem breve em PTW e foram fixadas em formol 4% em PTW (anexo I).

No caso das amostras tratadas com sonda marcada com biotina (3OV1), o tampão de coloração foi substituído por tris 50mM pH=7.2, quer na lavagem anterior à coloração, quer durante a revelação, em que 1.5 ml de DAB (1mg/ml) e 30µl de H₂O₂ (30vol.) foram adicionados a 30 ml de tris 50mM pH=7.2. Esta reacção ocorreu também no escuro e com agitação, durante aproximadamente cinco horas. Neste caso não foi feita fixação com formol a 4%, como indicado para a sonda F3BR3.

Tabela 11 – Principais passos do protocolo para a *hibridação in situ*

Sonda F3BR3	Sonda 3OV1
<ul style="list-style-type: none"> - Desparafinação e hidratação das amostras (Xilol - 2× 10min + 5min; 100% EtOH - 2× 5min; 96% EtOH - 1× 5min; 70% EtOH - 1× 5min). - Lavagens em PTW - 2× 10min. 	<ul style="list-style-type: none"> - Desparafinação e hidratação das amostras (Xilol - 2× 10min + 5min; 100% EtOH - 2× 5 min; 96% EtOH - 1× 5 min; 70% EtOH - 1× 5min). - Inativação da peroxidase endógena (3% H₂O₂ (30vol) numa solução de 70% PBS:30% metanol - Lavagens em PTW - 2× 10min.
<ul style="list-style-type: none"> - Pré-hibridação com solução Hibridação previamente aquecida a 58°C durante 5h. - Hibridação – A solução de hibridação foi substituída por uma fresca a que foi adicionada 1µl da sonda F3BR3 e incubou-se durante a noite. 	<ul style="list-style-type: none"> - Pré-hibridação com solução Hibridação previamente aquecida a 58°C durante 5h. - Hibridação – A solução de hibridação foi substituída por uma fresca a que foi adicionada 1µl da sonda 3OV1 e incubou-se durante a noite.
<ul style="list-style-type: none"> - Lavagens para remoção do excesso de sonda (2× SSC a 58°C – 3 × 5min; 1×SSC a 58°C – 2 × 5min) - Tratamento das amostras com RNase A (1mg/ml em 2× SSC) durante 30 min. - Lavagens para remoção dos restos de RNase A (2×SSC e 2% CHAPS – 2 × 10min + 5min; 2×SSC: PTW (1:1) – 5min; PTW – 5min) 	<ul style="list-style-type: none"> - Lavagens para remoção do excesso de sonda (2× SSC a 58°C – 3 × 5min; 1×SSC a 58°C – 2 × 5min) - Tratamento das amostras com RNase A (1mg/ml em 2× SSC) durante 30 min. - Lavagens para remoção dos restos de RNase A (2×SSC e 2% CHAPS – 2 × 10min + 5min; 2×SSC: PTW (1:1) – 5min; PTW – 5min)
<ul style="list-style-type: none"> - Reacção de bloqueação (Solução de bloqueação + 10% soro de ovelha – 3h) - Reacção de anticorpo (Solução de bloqueação + 10% soro de ovelha + <i>Anti-digoxigenine-FAB-fragments</i> – prop. 1:200 do stock original – 1h:30min - Lavagens para remoção dos restos do anticorpo (PTW – 2× 10min) - Lavagem em tampão de coloração (1× 10min) 	<ul style="list-style-type: none"> - Reacção de bloqueação (Solução de bloqueação + 10% soro de ovelha – 3h) - Reacção de anticorpo (Solução de bloqueação + 10% soro de ovelha + <i>Anti-biotin-whole-molecule</i> – prop. 1:200 do stock original – 1h:30min - Lavagens para remoção dos restos do anticorpo (PTW – 2× 10 min) - Lavagem em tris 50mM pH=7.2 (1× 10 min)
<ul style="list-style-type: none"> - Coloração com NBT/BCIP em tampão de coloração – 7h - Lavagem em PTW – 5min - Fixação em 4% formol/PTW – 20min. 	<ul style="list-style-type: none"> - Coloração em 1.5 ml DAB (1mg/ml)/30µl de H₂O₂ (30vol.) em 30 ml de tris 50mM pH=7.2 – 5h - Lavagem em PTW – 5min

Reacção de contra coloração e preparação definitiva

Para a contra coloração as amostras foram passadas em PTW (2×5min) e de imediato colocadas em verde de metilo a 0.1% durante 12 minutos. Este corante marca especificamente o núcleo das células. Cada lâmina foi rapidamente passada por água destilada, cuidadosamente limpa e ligeiramente seca antes de colocada em 100% etanol durante aproximadamente 30 segundos para uma rápida desidratação. Para melhorar a transparência das lâminas e para preparar os tecidos para a preparação definitiva, estas passaram por duas lavagens em xilol com duração de 10 minutos cada e de seguida montadas em DPX (Fluka).

Durante a observação ao microscópio, as zonas que exibiam sinal positivo foram identificadas e fotografadas com uma câmara digital (Olympus - DP11) acoplada a um microscópio (Olympus - BH2).

4.2.5.3 Controlo negativo

Para garantir que a hibridação das ribossondas é específica e que o resultado obtido não é consequência de uma hibridação não específica, foram realizados dois tipos de controlos negativos: (1) hibridação *in situ* sem a aplicação de sonda e (2) hibridação *in situ* em tecidos que foram previamente tratados com RNase.

No primeiro caso o procedimento de hibridação *in situ* foi idêntico ao descrito anteriormente, com excepção da etapa de hibridação que foi realizada usando solução de hibridação à qual não foi adicionada sonda. No segundo caso, os cortes histológicos foram tratados com RNase (0.02mg/ml em 1×PBS) durante 20min a 37°C, logo após a etapa de desparafinação e re-hidratação. Seguidamente, o procedimento de hibridação *in situ* decorreu como descrito anteriormente. Diversas lâminas correspondentes a cada tipo de tecido foram utilizadas nos respectivos controlos negativos.

4.2.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

Com o objectivo de caracterizar a localização da aromatase na glândula pituitária em relação às principais células endócrinas, foi realizado um ensaio de imunohistoquímica, no qual foram utilizados anticorpos específicos para as células secretoras de hormona do crescimento (GH), prolactina (PRL) e somatolactina. Deste modo, foi possível relacionar a localização das principais células secretoras de hormonas da pituitária e a localização dos transcritos das duas aromatases. A imunohistoquímica foi realizada de acordo com o seguinte protocolo.

Desparafinação e hidratação

O processo de desparafinação e re-hidratação é em tudo semelhante ao descrito para a metodologia da hibridação *in situ*. Após a lavagem com etanol a 70%, é também feito a desactivação da peroxidase endógena, utilizando H_2O_2 em (MeOH/PBS), uma vez que o anticorpo secundário se encontra associado à peroxidase, que será responsável pela deposição do cromogénio durante a revelação. Em seguida, foram efectuadas duas lavagens em água destilada (5min cada) e duas lavagens adicionais com PBS por igual período de tempo.

Reacções de bloqueação e anticorpos

Após a hidratação as lâminas foram colocadas em solução de bloqueação durante uma hora à temperatura ambiente. Após este passo, esta solução foi substituída pelos anticorpos primários. As lâminas foram colocadas na horizontal e os anticorpos foram individualmente depositados sobre cada corte e incubados à temperatura ambiente durante 3h. As amostras foram lavadas em PBS (2× 5min) e incubadas com o anticorpo secundário (anti coelho IgG, 1/50 em PBS, Sigma-Aldrich) durante uma hora.

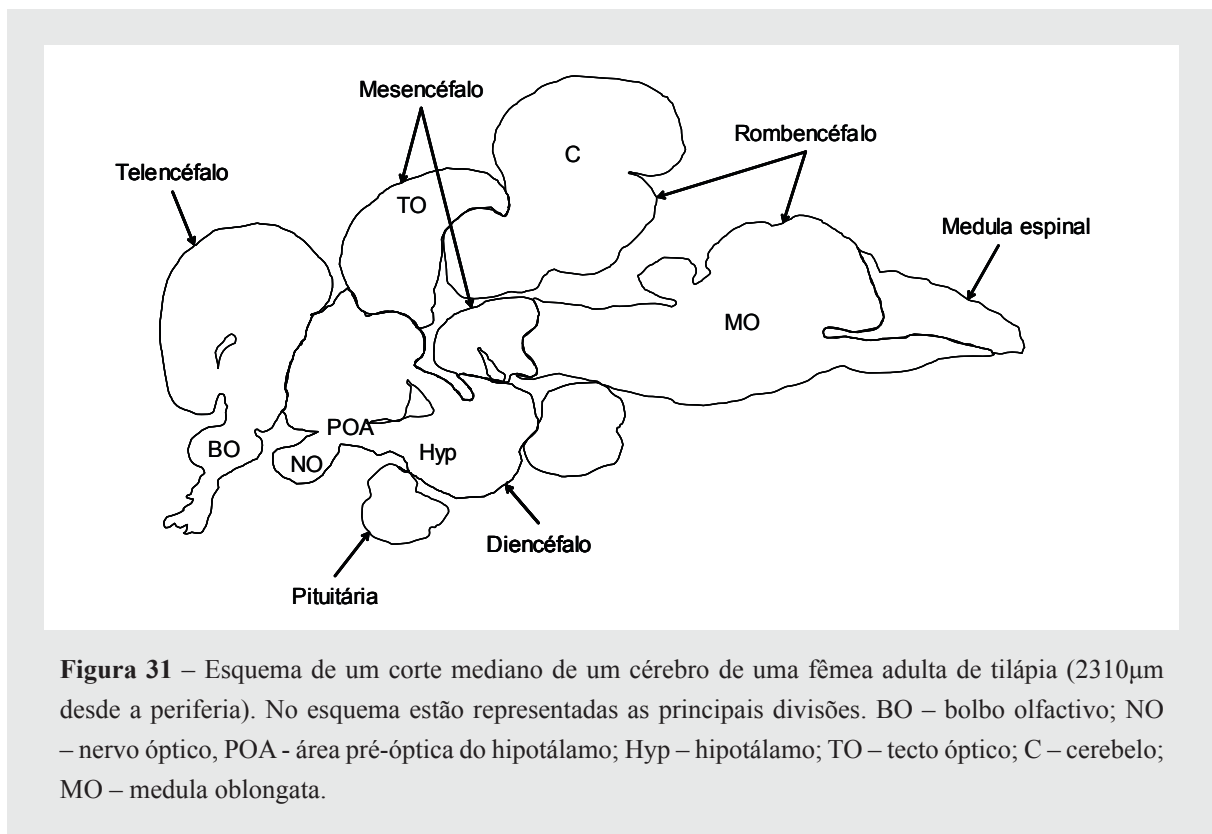
Revelação

Para remover por completo o excesso de anticorpo secundário, as amostras foram lavadas em tris 0.1 M pH=7.6 (2×10 min). A mesma solução utilizada nestas lavagens foi utilizada para diluir a DAB (1mg/ml), nas seguintes proporções: DAB, 500µl, H₂O₂ (30vol.), 30µl, tris 0.1 M pH=7.6, 25ml. A revelação ocorreu durante 20min, as lâminas foram lavadas e foi efectuada uma contra coloração com verde de metilo a 0.1% (ver secção 4.2.4). Os cortes foram desidratados e as preparações definitivas montadas com DPX (Sigma).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 MORFOLOGIA GERAL DO CÉREBRO DE TILÁPIA

A Figura 31 esquematiza um corte sagital mediano de um cérebro de *O. mossambicus* (correspondendo a 2310µm a partir da periferia do tecido) em que são representadas as principais divisões baseado na classificação de Wulliman (1996).



O cérebro deste teleósteo é simétrico longitudinalmente e composto por 5 regiões principais: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo e espinal-medula. Cada uma destas grandes regiões pode ser subdividida em estruturas mas pequenas. Por exemplo o telencéfalo é formado pelos bolbos olfactivos (BO - estruturas pares), e pelas áreas dorsal e ventral telencefálicas. O diencéfalo é constituído por cinco grandes divisões. São elas o epitélamo, o tálamo dorsal, o tálamo ventral, o tubérculo posterior e o hipotálamo. O diencéfalo merecerá algum destaque, uma vez que assegura a mediação de alguns estímulos exteriores e a pituitária, sendo por isto crucial na mediação dos estímulos endócrinos. A área pré-óptica do hipotálamo é uma estrutura que constitui uma região intermédia entre o telencéfalo e o diencéfalo. Embora haja alguma controvérsia sobre a localização exacta desta estrutura, ela será aqui considerada como parte do diencéfalo. O mesencéfalo pode também ser subdividido. Dorsalmente encontra-se uma estrutura multi-sensorial, o tecto óptico (TO), e podem ainda ser distinguidos o toro semicircular (*torus semi-circularis*) e o tegumento (*tegumentum*). No rombencéfalo destacam-se essencialmente o cerebelo e a medula oblongata. Por fim, a espinal-medula que conduz os estímulos neuronais às restantes partes do corpo e que não será abordada neste trabalho.

Além das estruturas referidas acima, na Figura 31 são ainda apresentadas as localizações aproximadas dos bolbos olfactivos, que se localizam rostro-ventralmente em relação ao telencéfalo do qual ainda fazem parte, os nervos ópticos e a área pré-óptica entre o telencéfalo e a região mais rostral do diencéfalo, e o hipotálamo. No decorrer a apresentação dos resultados desta secção, sempre que necessário, serão feitas alusões a núcleos específicos para melhor compreensão das figuras.

Na tilápia, como nos restantes peixes, a morfologia das regiões do cérebro reflectem de algum modo o seu estilo de vida. Neste teleósteo as regiões que parecem ser mais hipertrofiadas são as do tecto óptico e os bolbos olfactivos.

A morfologia geral dos tecidos observada através da coloração com hematoxilina e eosina não permitiu detectar diferenças entre o cérebro de machos e fêmeas. Por esta razão será dada uma descrição geral que pode ser aplicada a ambos os sexos.

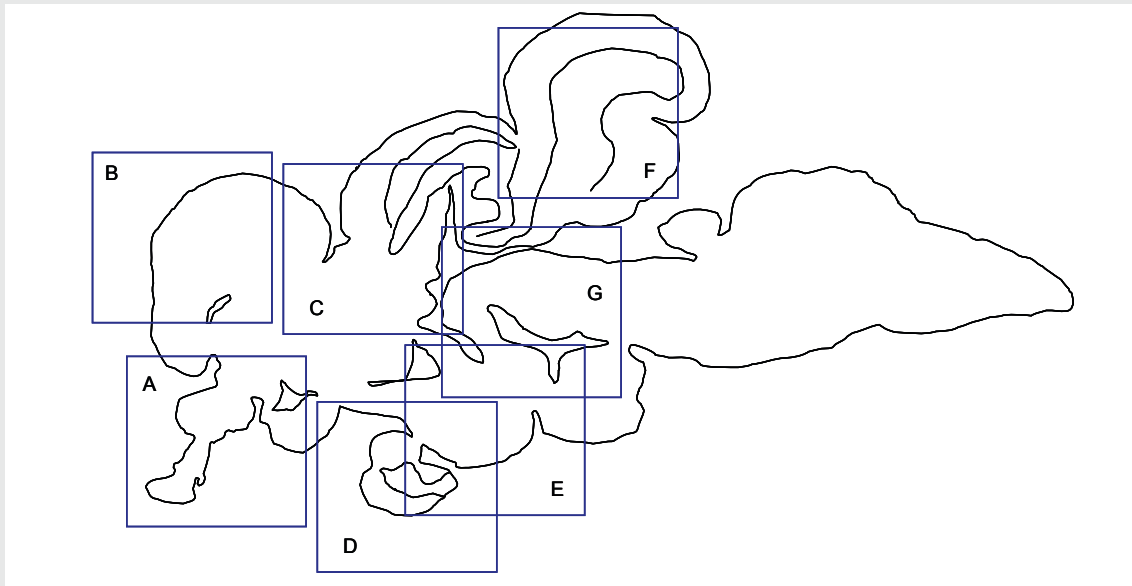


Figura 32 – Representação esquemática da região mediana sagital do cérebro de uma fêmea. O corte apresentado tem como todos os restantes 11 μ m de espessura e situa-se sensivelmente a 2288 μ m da periferia do tecido. Neste corte encontram-se a azul identificadas as principais regiões que serão individualizadas na Figura 33.

Na Figura 32 encontram-se identificados os bolbos olfactivos (A) o telencéfalo (com destaque para área dorsal telencefálica - B), a região posterior do telencéfalo e porção rostral do tecto óptico (C), a pituitária com o hipotálamo localizado imediatamente por cima (D), a região caudal do diencéfalo (E), o cerebelo (individualizando particularmente o *corpus cerebelli* - F), a medula oblongata e a região inicial da espinhal-medula. Estas regiões foram escolhidas por serem algumas das que mais revelaram sinais específicos no trabalho subsequente.

A Figura 33 corresponde a um conjunto de fotografias tiradas ao corte da região sagital mediana do cérebro da fêmea, apresentado na Figura 32, e corado com hematoxilina e eosina. Estes corantes marcam respectivamente o núcleo e o citoplasma das células, pelo que esta coloração para além de fornecer a ideia geral de algumas regiões do tecido, permite ainda a percepção de qual das regiões sub-celulares está efectivamente a ser marcada pelas sondas específicas. Na Figura 33A podem ser observados os bolbos olfactivos que projectam diferentes tractos neuronais para as restantes áreas do telencéfalo. Nesta estrutura é possível observar a alternância entre regiões fundamentalmente axoniais e outras celulares observáveis pela coloração dos núcleos em tom violeta.

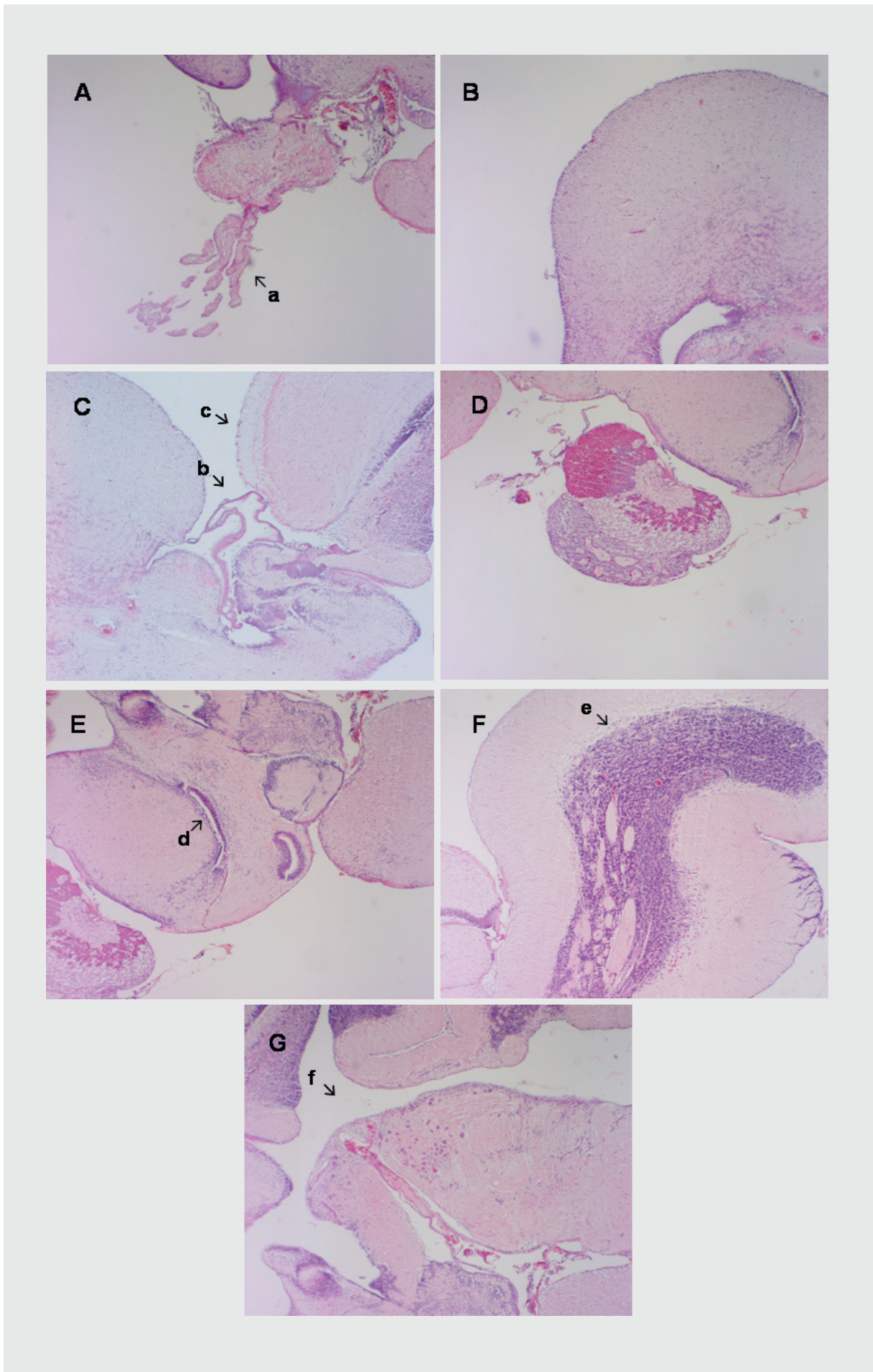


Figura 33 – Resultado da coloração com hematoxilina e eosina a um corte mediano do cérebro de uma fêmea. A – no centro o bulbo olfactivo e projectadas ventralmente as fibras olfactivas. B – Região superior do telencéfalo; C – Região que compreende o diencéfalo, mais propriamente os tálamos ventral e dorsal; D – Pituitária com o hipotálamo imediatamente situado por cima; E – região posterior do diencéfalo e início da medula oblongata, F – cerebelo; região ventral posterior do mesencéfalo, região posterior do diencéfalo e início da medula oblongata. Todos os cortes foram fotografados a uma ampliação de 40×. Nestas fotografias são ainda realçadas algumas regiões particulares como é o caso do nervo e dos bulbos olfactivos (a), de uma estrutura membranar que se localiza entre o telencéfalo e o tecto óptico (b); o tecto óptico (c); o ventrículo diencefálico (d) que apresenta um conjunto de células que orientam os seus núcleos para o ventrículo; o corpo do cerebelo (e) que é densamente celular e que tem na sua periferia uma camada de células de grandes dimensões que o separam da restante estrutura do cerebelo, maioritariamente axonial (divisão mediana da válvula do cerebelo); e por fim o ventrículo tectal (f).

Na parte mais rostroventral desta fotografia pode ainda ser observado o nervo olfactivo principalmente axonial e que termina numa região celular. A Figura 33B evidencia a área dorsal telencefálica que na sua zona central (posterior esquerdo na fotografia) apresenta uma zona fundamentalmente celular. Aliás, todo o telencéfalo parece ser fundamentalmente celular, embora a região média da área dorsal telencefálica apresente uma densidade de núcleos muito inferior à sua região central. A Figura 33C permite observar, na sua parte mais caudal, o ventrículo tectal médio que se situa anteriormente ao ventrículo rombencefálico (Figura 33G). O ventrículo tectal médio é delimitado dorsalmente pelo toro longitudinal (*torus longitudinalis*) que se situa ventralmente ao tecto óptico. Toda a periferia da região ventricular parece ser composta por zonas celulares, e a restante porção, fundamentalmente axonial, embora com corpos celulares dispersos. A zona do toro longitudinal propriamente dita é uma zona fundamentalmente celular. Segundo (Wullimann *et al.*, 1996), a região mais superficial do tecto óptico não é composta por fibras retiniais como na maior parte dos vertebrados, mas sim essencialmente constituída por axónios cujas pericárias ficam localizadas no toro longitudinal. Na região inferior desta fotografia estão ainda presentes parte dos tálamos dorsal e ventral. A Figura 33D mostra a glândula pituitária ao centro e na parte superior da fotografia o hipotálamo, maioritariamente axonial, embora na periferia do tecido e em torno do ventrículo diencefálico exista uma grande concentração de corpos celulares que parecem projectar

os seus axónios para o exterior destas regiões. A Figura 33E centra-se na parte mais caudal do diencéfalo onde se encontra bem evidenciado o ventrículo diencefálico e o recesso posterior deste ventrículo. De novo, em torno das cavidades dos ventrículos pode ser observado uma grande quantidade de corpos celulares. Estas zonas celulares parecem projectar-se dorso-rostralmente até atingir o ventrículo tectal. A fotografia F da Figura 33 representa o cerebelo, característico pelo corpo do cerebelo (*corpus cerebelli*), região central com uma grande concentração de núcleos corados, o que determina a presença de uma zona fundamentalmente celular, em contraste com a divisão média da válvula do cerebelo onde se conseguem distinguir claramente as projecções axoniais para a periferia do tecido. Na separação destas duas estruturas, encontram-se as células de *Purkinje* que são neurónios extremamente ramificados. Nesta fotografia é ainda possível distinguir o lobo caudal do cerebelo, com tractos celulares a projectarem-se rostro-caudalmente. Por último, na Figura 33G, observa-se a região mais rostral da medula oblongata que se desenvolve ventralmente ao ventrículo rombencefálico. Esta região é maioritariamente axonial, embora com alguns núcleos de corpos celulares dispersos.

4.3.2 EXPRESSÃO DA AROMATASE NO CÉREBRO DO MACHO

A Figura 34 é uma representação de observações de câmara clara de diferentes cortes do cérebro de um macho adulto e sexualmente activo, que apresentava na altura da recolha dos tecidos uma intensa coloração sexual. Provavelmente devido às grandes dimensões do cérebro do macho, este sofreu alguma distorção durante o processamento histológico. Este facto, bem patente se compararmos a Figura 34 com a Figura 43 (cérebro da fêmea), levou a que no caso do macho a pituitária tivesse sido deslocada rostralmente em relação a o que seria de esperar. Nesta figura, o esquema (A) apresenta a região mais exterior do cérebro (situado aproximadamente a 400 μ m), onde podem ser observados parte do tronco cerebral e da medula oblongata em baixo, a região intermédia corresponde sensivelmente à porção lateral do diencéfalo, e, em cima, a zona lateral do tecto óptico. A Figura 34B, um pouco mais para o interior do cérebro (1280 μ m), apresenta uma maior diversidade

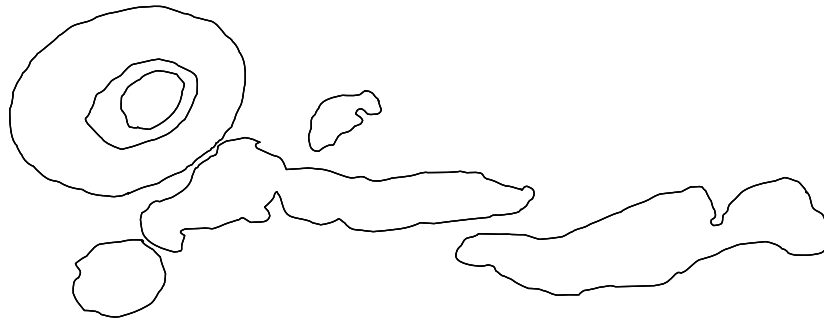
de estruturas. Neste esquema é já possível visualizar o telencéfalo e o tecto óptico, com realce para a zona cinzenta periventricular do tecto óptico, imediatamente por cima do ventrículo tectal. É possível observar também a região lateral do cerebelo, que se situa entre o tecto óptico e a crista do cerebelo (*crista cerebellaris*) e que, por sua vez, se situa rostralmente ao ventrículo rombencefálico. Projectado rostralmente, pelo efeito da distorção incutida ao tecido durante o processamento, localiza-se a região adjacente aos bolbos olfactivo. Neste esquema é já possível identificar a região diencefálica pelo menos com as zonas dos tálamos dorsal e ventral e do hipotálamo. Ventralmente, em relação ao cerebelo, desenvolve-se a medula oblongata que culmina a espinal-medula. Por último, o corte C da Figura 34, correspondente à região mediana do cérebro deste macho (aproximadamente 1600µm a partir da periferia). Neste esquema, de uma forma geral, podem observar-se as mesmas estruturas que no corte anterior, apenas numa outra secção, com excepções para os lobos facial e vagal que surgem situados em posição posterior relativamente à crista do cerebelo já na medula oblongata. Na região ventral do corte pode ser observado o núcleo difuso do lobo inferior e o corpo mamilar e, imediatamente a seguir à região de localização dos bolbos olfactivos, em posição ventral, a glândula pituitária também deslocada rostralmente em relação à sua posição original.

A Figura 34 permite visualizar globalmente as principais regiões do cérebro para que se possa ter uma noção geral de onde ocorrem os sinais específicos da aromatase. Note-se que à medida que os cortes se sucedem desde a periferia até à região central do cérebro, as estruturas encontradas vão variando. A progressão dessas estruturas é identificada para que, em cada corte, a localização dos sinais seja tão clara quanto possível.

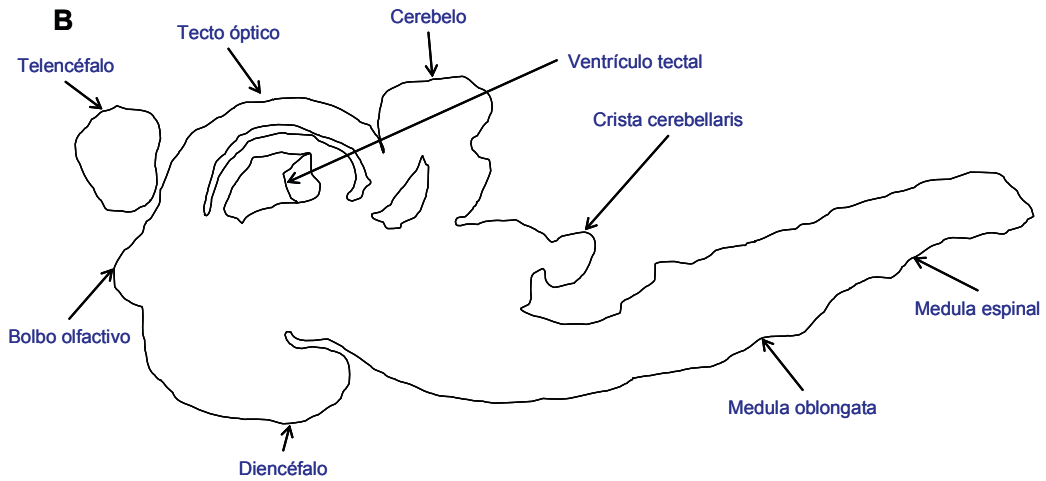
A pesquisa dos transcritos de mRNA dos genes *Cyp19B* e *Cyp19A* no cérebro por hibridação *in situ*, revelou a presença de ambos os genes em ambos os sexos. O sinal detectado para cada gene pôde ser encontrado quer no cérebro quer na pituitária, embora com intensidades diferentes. A expressão dos dois genes foi detectada de forma muito particular na pituitária, que é apresentada em separado na secção 4.3.4.

Cérebro de um macho adulto

A



B



C

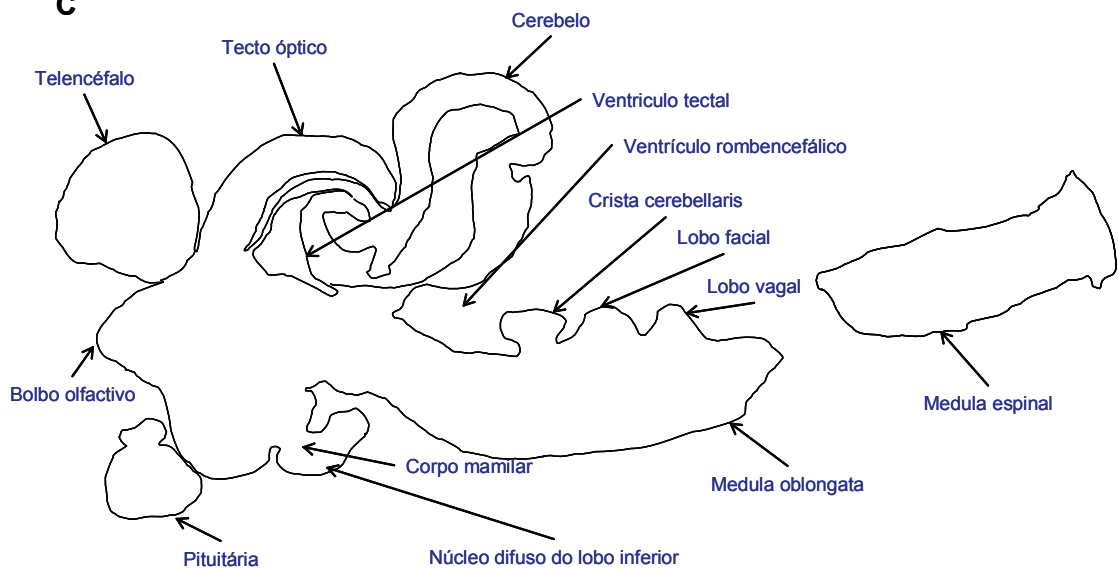
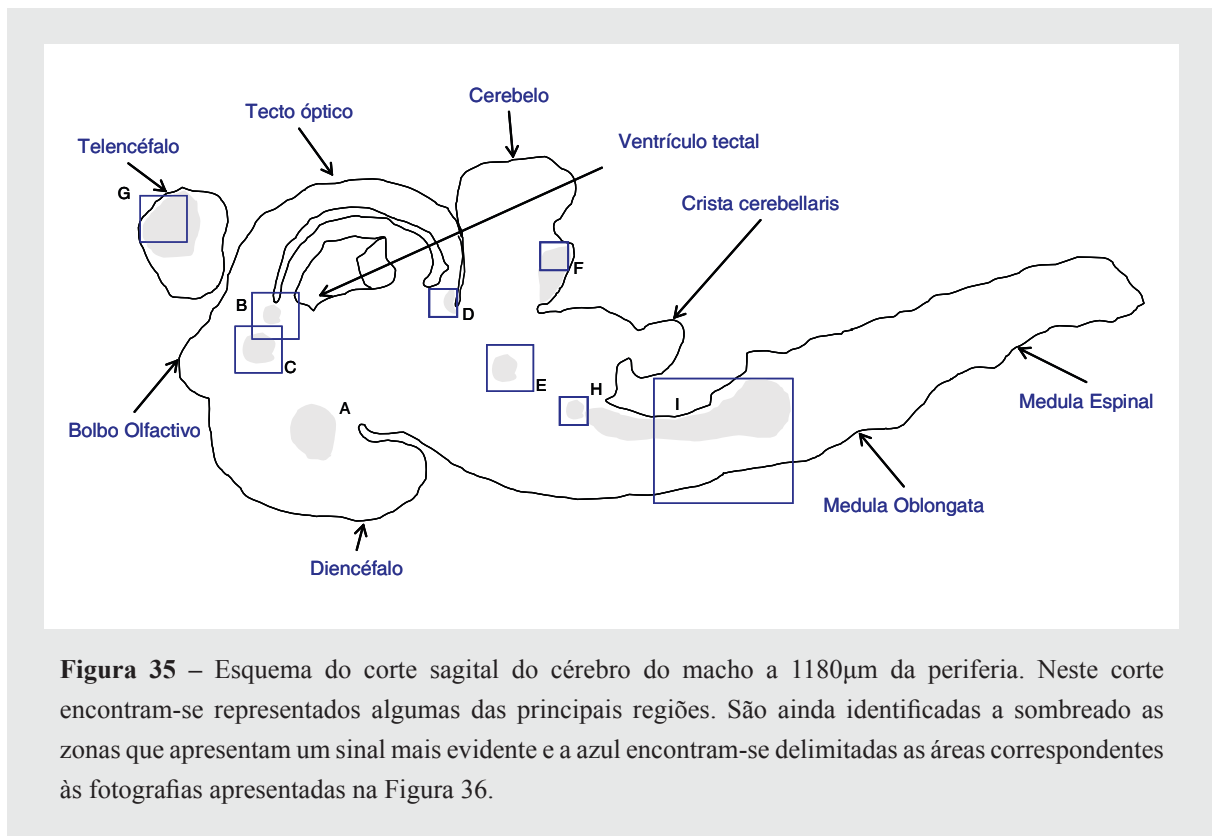


Figura 34 – Esquema de três cortes sagitais do cérebro de um macho de *Oreochromis mossambicus*. As três imagens **A**, **B** e **C** correspondem respectivamente a cortes situados a 400, 1280 e 1600µm medidos da periferia para o interior do cérebro. Cada corte foi feito a uma espessura de 11µm, sendo o último corte correspondente sensivelmente à zona mediana do cérebro. Nos cortes encontram-se representadas algumas das regiões e das estruturas mais relevantes a este trabalho. É dado particular realce ao telencéfalo e bulbo olfativo, ao tecto óptico, diencéfalo e cerebelo e também a alguns núcleos claramente evidentes ao longo da medula oblongata. No corte C é também apresentado um esquema da pituitária.

4.3.2.1 Distribuição dos transcritos do gene *Cyp19B* no cérebro do macho

A sonda F3BR3 utilizada para detectar a aromatase do cérebro (gene *Cyp19B*) não revelou qualquer sinal no corte mais periférico (Figura 34A). Os sinais tornam-se mais claros à medida que nos aproximamos da região central do tecido.

Na secção a 1280µm, foi observado um grande conjunto de núcleos cerebrais em que foi possível detectar transcritos de *Cyp19B*. Na Figura 35 encontram-se esquematizadas um conjunto de regiões onde foram representados a sombreado os locais específicos onde foram encontradas reacções positivas, sem consideração da intensidade do sinal. De entre as várias regiões, optou-se por não mostrar na imagem a posição assinalada com (A), uma vez que o sinal foi pouco expressivo e de baixa intensidade. Esta região é fundamentalmente celular, com um núcleo bastante bem individualizado de células no que parece ser a região do hipotálamo. Assinalados com as letras B e C no mesencéfalo, ventralmente em relação ao tecto óptico, podem também ser identificados núcleos que revelam sinal específico. As zonas assinaladas com as letras D e G localizam-se respectivamente na transição do tecto óptico para o cerebelo, na divisão lateral da válvula do cerebelo, e no telencéfalo. O lobo caudal do cerebelo, parece também reagir positivamente à sonda F3BR3 (Figura 35F). Os restantes sinais detectados com esta sonda e expressos na Figura 35 (E, H, I e J) encontram-se dispersos ao longo da medula oblongata estendendo-se desde a zona ventral ao cerebelo e estendendo-se ventralmente à crista do cerebelo, ao ventrículo rombencefálico e aos lobos facial e vagal.



Na Figura 36 são apresentadas as fotografias correspondentes às secções acima referidas. Estes sinais são particularmente evidentes na região ventral do tecto óptico com dois núcleos muito bem definidos (Figura 36B e C), no que aparenta serem núcleos de corpos celulares inseridos em regiões maioritariamente axoniais. Uma outra região com sinal bastante evidente é a região que medeia a fronteira entre o tecto óptico e o cerebelo, mais especificamente na divisão média da válvula do cerebelo (que é uma estrutura que se projecta rostralmente para a região mesencefálica) (Figura 36D) e que consiste num conjunto de células bem individualizado. Também no lobo caudal cerebelo (Figura 36F) conjuntos de corpos celulares parecem projectar-se horizontalmente para o exterior do tecido, revelando estes núcleos um sinal positivo embora não muito marcado. O lobo caudal do cerebelo individualiza-se da restante fracção por ser maioritariamente celular, em contraste com a sua envolvente axonial. Na área dorsal mediana do telencéfalo (Figura 36G), grupos de células apresentam uma coloração forte. Toda esta região é celular, embora não de forma muito densa. As restantes fotografias da Figura 36 (E, H e I) localizam-se na medula oblongata.

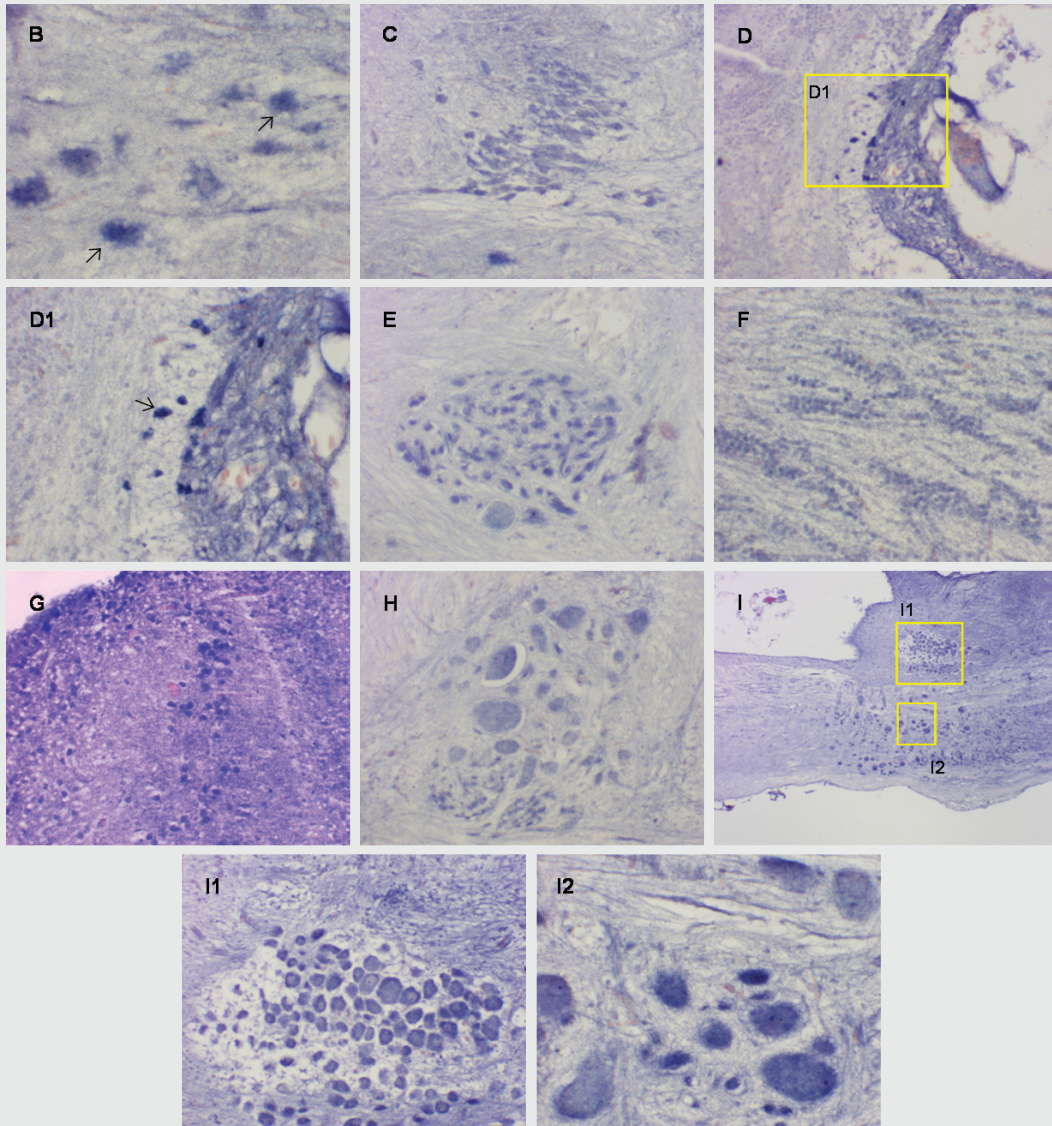


Figura 36 – Hibridação *in situ* com a sonda F3BR3. A – O sinal aqui indicado localiza-se no diencéfalo em posição caudal ao bulbo olfativo: Ampliação 100×; B – O sinal localiza-se imediatamente por baixo do início do tecto óptico provavelmente no tálamo ventral: Ampliação - 400×; C – sinal localizado na área telencefálica dorsal. Ampliação - 200×; D – divisão média da válvula do cerebelo: D – Ampliação 200×; D1 – Ampliação 400×; E – região anterior do rombencéfalo (medula oblongata): Ampliação 200×; F – lobo caudal do cerebelo: Ampliação - 400×; G – telencefalo, região mediana da área dorsal telencefálica: Ampliação - 400×; H, I, J – diferentes regiões da medula oblongata que expressam núcleos específicos de células com sinal positivo (H, I). Ampliações: H - 200×; I - 40×; I1 - 200×; I2 - 400×; J - 100×

A região da medula oblongata é rica em diferentes núcleos celulares e tractos neuronais. As fotografias E, H e I focam alguns destes núcleos, que são perfeitamente individualizados e que são fundamentalmente celulares em relação às estruturas envolventes. Embora a localização precisa dos núcleos seja difícil de determinar, o que impede a sua identificação exacta, a Figura 36H parece corresponder à base sensorial do nervo facial (VII) que controla as brânquias.

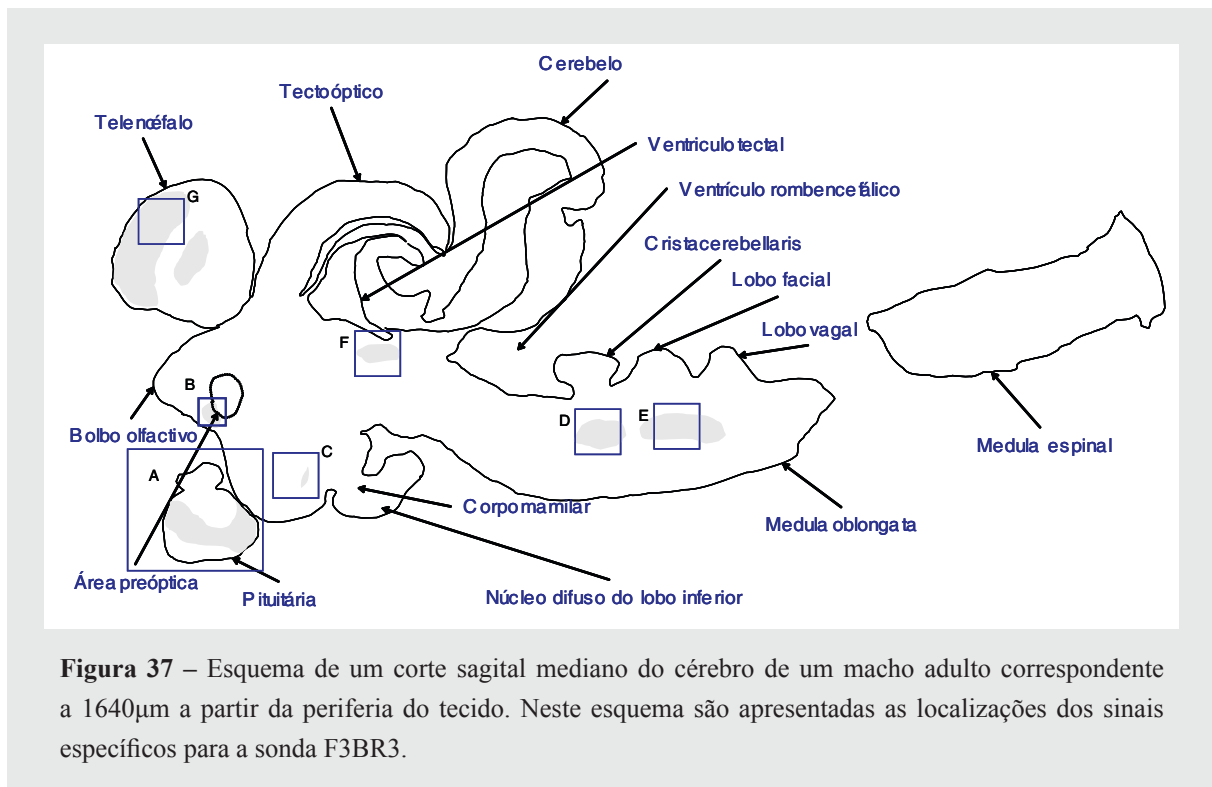


Figura 37 – Esquema de um corte sagital mediano do cérebro de um macho adulto correspondente a 1640 μ m a partir da periferia do tecido. Neste esquema são apresentadas as localizações dos sinais específicos para a sonda F3BR3.

O corte correspondente à região mediana (1640 μ m) do cérebro do macho está esquematizado na Figura 37 e as respectivas imagens dos sinais positivos encontrados, na Figura 38. Na Figura 37, observa-se também a pituitária que, como referido, será abordada na secção 4.3.4, pelo que a sua representação no esquema é meramente orientadora. A maioria das estruturas representadas neste corte foram já identificadas e descritas nos cortes anteriores. São exemplos o telencéfalo, o tecto óptico, o cerebelo, os bolbos olfactivos e as medulas oblongata e espinal. Por esta razão, apenas as estruturas ainda não descritas serão aqui referidas. O corpo mamilar e o núcleo difuso do lobo inferior situam-se na porção mais caudal do hipotálamo. O núcleo difuso do lobo inferior resulta da migração das células periventriculares que circundam os recessos do ventrículo diencefálico e é constituído por

células de pequenas dimensões. A porção caudal do lobo inferior situa-se ventralmente ao tegumento e inclui o corpo mamilar, que integra a informação oriunda dos núcleos sensoriais e motores.

A área pré-óptica do hipotálamo situa-se na porção mais rostral do diencefalo, imediatamente por cima do nervo óptico. Pode ser dividida num núcleo ventral pré-óptico parvocelular e um núcleo dorsal pré-óptico magnocelular, que no entanto não foram aqui identificados. A área pré-óptica desenvolve um tracto de fibras nervosas que atravessam o tracto óptico e se projectam maioritariamente para a hipófise. Os neurónios que constituem

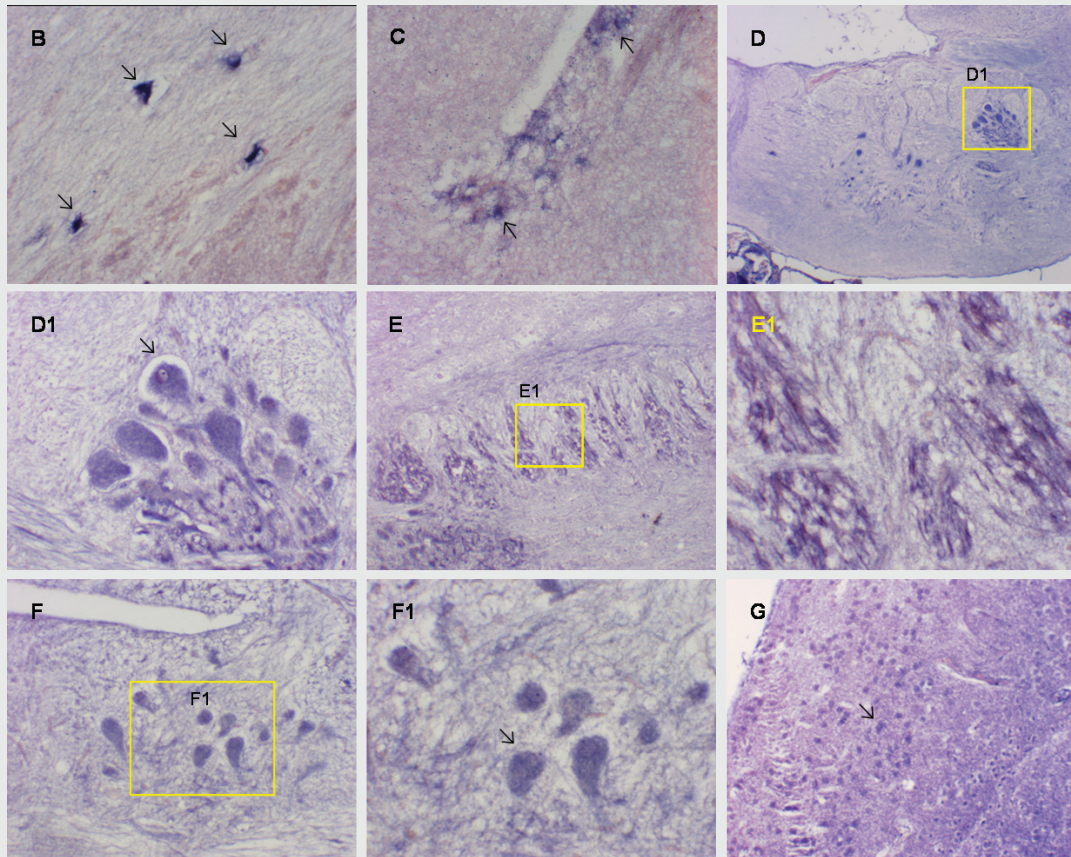


Figura 38 – Híbridação *in situ* com a sonda F3BR3 ao corte sagital mediano de um cérebro de macho (1760µm). B – Sinal entre a parte ventral do telencefalo e a região anterior do diencefalo: Amplia o - 400 ; C – recesso posterior do ventrículo diencefálico: Amplia o C - 400 ; D, E – diferentes núcleos de células dispersos ao longo da medula oblongata. D parece corresponder ao núcleo facial motor (NVIIIm) onde se insere o núcleo s nico motor (SMN): D - 40 , D1 - 200 , E - 100 , E1 - 400 ; F – tálamo dorsal ventralmente situado em rela o ao ventrículo tectal: Amplia o F - 200 , F1 - 400 ; G – telencefalo, região mediana da área dorsal telencefálica: Amplia o 400 . As setas indicam alguns exemplos de alguns sinais específicos.

a área pré-óptica são de grandes dimensões. De forma geral, a pericária das células da área pré-óptica encontra-se nos peixes geralmente associada a vasos sanguíneos, sendo esta região normalmente rica em fluxo sanguíneo. Os lobos facial e vagal situam-se em posição posterior à crista do cerebelo e situam-se em posição central a um conjunto de tractos que da região dorsal para a ventral são identificados como o griseu central, fundamentalmente celular; o fascículo longitudinal mediano (MLF) que se estende ao longo de uma grande porção da medula oblongata e que é fundamentalmente axonial; a comissura ventral telencefálica (Cven) cuja estrutura é composta por núcleos celulares mais ou menos bem individualizados; e de novo pelo fascículo longitudinal mediano. Ainda ventralmente colocado em relação ao lobo vagal encontra-se o núcleo vagal motor (NXm) que apresenta um conjunto de células extremamente grande e que se individualiza perfeitamente (Figura 37).

Na Figura 38 os destaques situam-se fundamentalmente na região mediana da área dorsal telencefálica (Figura 38G), no tálamo dorsal imediatamente por baixo do ventrículo tectal e do tecto óptico (Figura 38F) e que parece projectar-se em diferentes núcleos celulares ao longo da medula oblongata, particularmente em dois núcleos específicos (Figura 38D, E, E1, E2). Os núcleos representados em D e F desta figura são característicos por serem compostos por células de grandes dimensões, o que caracteriza os núcleos motores. Embora neste caso a sua identificação não possa ser precisa, o núcleo apresentado na Figura 38F parece corresponder ao núcleo oculomotor (NIII), e o núcleo presente na Figura 38D parece corresponder ao núcleo facial motor (NVIIIm), onde se encontra inserido o núcleo sónico motor. A Figura 38E apresenta a visão geral (E) e em detalhe (E1) a comissura ventral rombencefálica. Foi também localizado um sinal em posição rostral à área pré-óptica, que embora bem definido, é extremamente localizado e restrito a um conjunto muito reduzido de células, inseridas numa região fundamentalmente axonial. Por último, pode também identificar-se um núcleo celular que apresenta uma reacção positiva clara à sonda F3BR3, que se localiza em torno do recesso lateral do ventrículo diencefálico, possivelmente no núcleo tuberal posterior e na zona dorsal do hipotálamo periventricular (Figura 38C).

No geral, e após analisadas estas três secções de tecido, as reacções específicas do

cérebro dos machos à sonda F3BR3 distribuem-se no telencéfalo, em algumas regiões do diencéfalo, mais especificamente no hipotálamo e no tálamo dorsal, no rombencéfalo, com alguma expressão no cerebelo, mas sobretudo ao longo da medula oblongata.

4.3.2.2 Distribuição dos transcritos do gene *Cyp19A* no cérebro do macho

Nesta secção são apresentados os resultados da hibridação *in situ* para o gene *Cyp19A* no cérebro de um macho de *O. mossambicus*, utilizando a sonda 3OV1. A abordagem será idêntica à da secção anterior, olhando para cortes adjacentes aos utilizados para a sonda F3BR3. A marcação da sonda 3OV1 foi feita com biotina, conjugada com peroxidase e foi utilizado DAB como substrato, o que produziu uma coloração castanha.

Nas duas primeiras secções analisadas (periferia até aproximadamente 1300 μ m), os sinais específicos não são muito claros, sendo por esta razão apresentados em conjunto na mesma imagem. Este resultado é de alguma forma coerente com o detectado com a sonda F3BR3 em que também não tinha sido possível detectar quaisquer sinais nesta região mais periférica do cérebro do macho. No entanto, parece haver algumas reacções positivas que serão apresentadas na Figura 40. As principais regiões que se encontram patentes na Figura 39 foram já caracterizadas em pontos anteriores, nomeadamente quando foi feita a descrição da Figura 34. Por esta razão, a mesma descrição não será aqui apresentada.

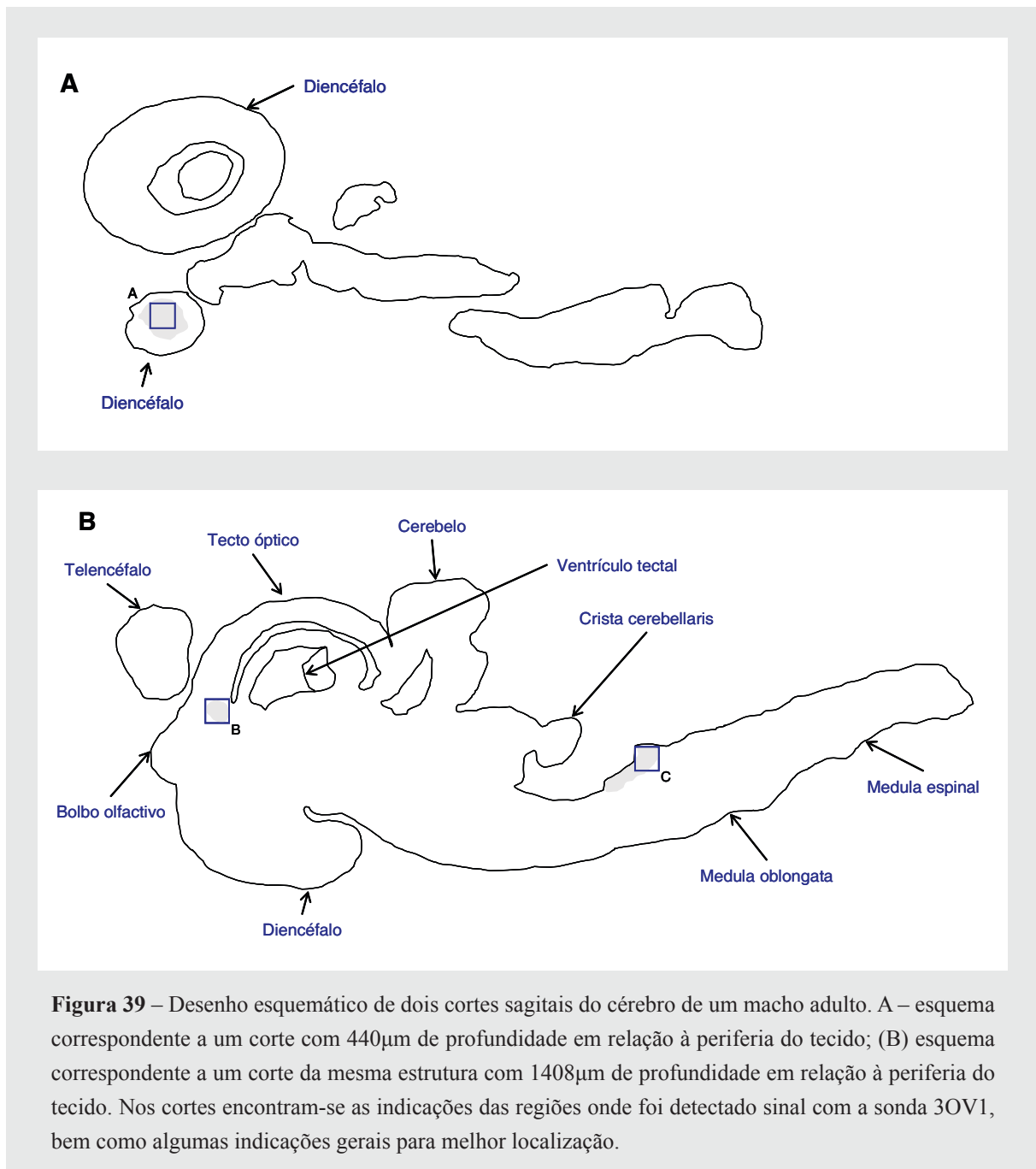


Figura 39 – Desenho esquemático de dois cortes sagitais do cérebro de um macho adulto. A – esquema correspondente a um corte com 440µm de profundidade em relação à periferia do tecido; (B) esquema correspondente a um corte da mesma estrutura com 1408µm de profundidade em relação à periferia do tecido. Nos cortes encontram-se as indicações das regiões onde foi detectado sinal com a sonda 3OV1, bem como algumas indicações gerais para melhor localização.

Na região mais periférica, apenas pôde ser apresentada uma reacção positiva na região diencefálica e imediatamente por baixo do tecto óptico, no que parece ser uma região francamente celular (Figura 40A). Ainda nesta região foi também detectado um sinal fraco que pareceu localizar-se numa estrutura membranar envolvente ao tecido nervoso.

Embora pouco claros, foram detectados dois sinais específicos para esta sonda na região até 1408µm. Um deles aparece associado à região inicial do tecto óptico, mais precisamente entre a zona cinzenta periventricular do tecto óptico e o tálamo dorsal (Figura 40B). A zona cinzenta periventricular do tecto óptico é rica em corpos celulares e a região

do tálamo dorsal que emerge por baixo da porção caudal do núcleo habenular ventral, aproximadamente na fronteira com mesencéfalo com o telencéfalo. O segundo (Figura 40C) apresenta um núcleo específico em que também pode ser identificado um sinal claro em posição ventral ao lobo vagal.

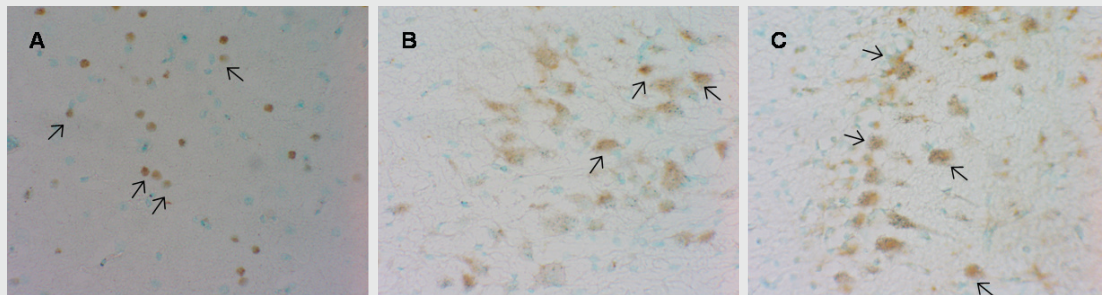
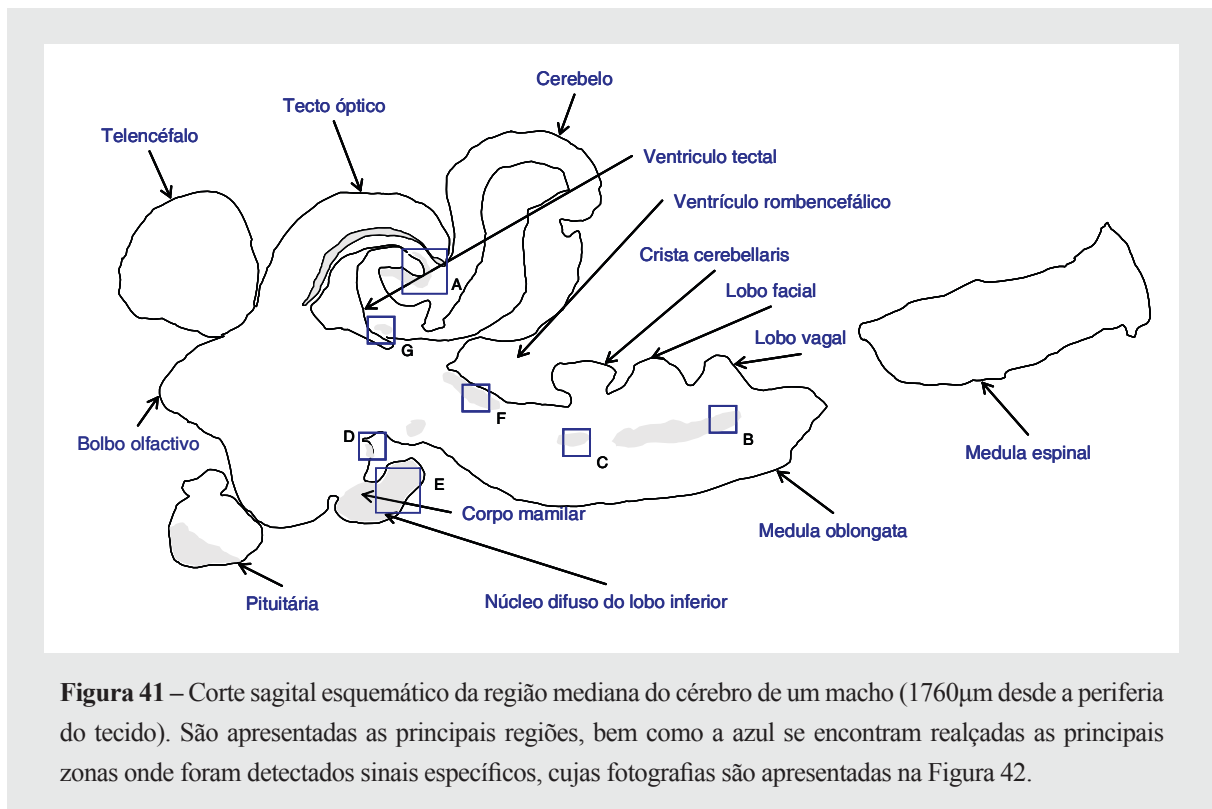


Figura 40 – Hibridação *in situ* com a sonda 3OV1. A – região diencefálica; B – Região rostral ventral do tecto óptico; C – Tracto celular localizado ventralmente ao lobo vagal. Ampliação: A – 400 ×; B – 400 ×; C – 400 ×.

Por último, o esquema do corte sagital correspondente à região mediana do cérebro do macho com o qual foi hibridada a sonda 3OV1. À semelhança do que foi feito anteriormente, a Figura 41 apresenta algumas das estruturas do cérebro e com um contorno azul estão ainda representadas as zonas que revelaram os sinais específicos mais claros e para os quais serão apresentadas as fotografias na Figura 42. Adicionalmente, este esquema apresenta ainda a sombreado as regiões em que foram detectados sinais positivos para o gene *Cyp19A*. Mais uma vez, embora neste corte de forma bastante mais clara, pode observar-se um tracto celular que se desenvolve ao longo da medula oblongata (Figura 41B, C) e que parece ter origem por baixo do tecto óptico e do ventrículo tectal, (Figura 41G). Este tracto localiza-se ao longo da comissura ventral telencefálica, fundamentalmente celular e com diferentes núcleos de células que se destacam pelas grandes dimensões, e do fascículo mediano longitudinal. Ambas as estruturas celulares se localizam ventralmente em relação à *crista cerebellaris*, ao lobo facial e ao lobo vagal. Este tracto celular parece projectar-se dorso-rostralmente pelo griseu central (Figura 41F) até atingir a região posterior do ventrículo tectal na base do toro longitudinal (Figura 41G).



Também a zona cinzenta periventricular do tecto óptico parece apresentar um sinal significativo. Esta região é fundamentalmente constituída por corpos celulares, projectando-se os axónios para a periferia. Outro sinal mais nítido encontra-se na porção mais caudal do toro longitudinal e perto da divisão média da válvula do cerebelo (Figura 41A), na transição do tecto óptico para o cerebelo. A Figura 41D mostra a região de ligação do corpo mamilar com o restante diencéfalo e, também aqui, pode ser observado um sinal específico.

A Figura 42 mostra as fotografias das principais regiões registadas na Figura 41. Foram seleccionadas seis regiões por apresentarem os sinais mais evidentes. A Figura 42A compreende a parte mais caudal do toro longitudinal que se situa sob o tecto óptico. O sinal específico situa-se em torno de uma região marcadamente celular, aparecendo associado à região nuclear. Nas Figura 42B e C os sinais de hibridação com o gene *Cyp19A* localizam-se na comissura ventral rombencefálica (Cven). Esta região é característica por ter núcleos específicos bem individualizados estendendo-se ao longo de toda a medula oblongata. Os sinais encontram-se de forma mais ou menos dispersa nas regiões identificadas na Figura 41.

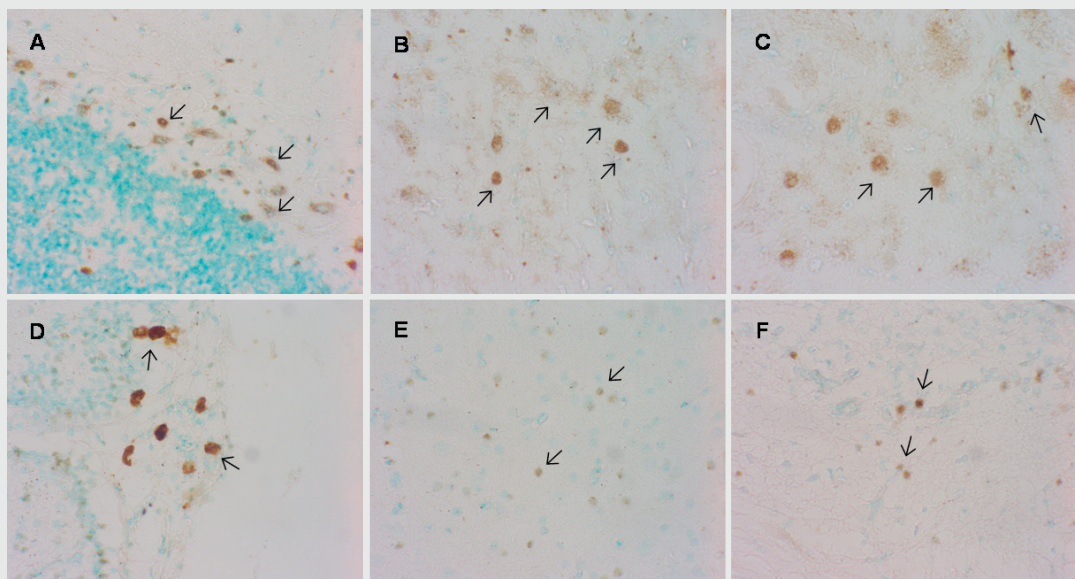


Figura 42 – Hibridação *in situ* com a sonda 3OV1. A – tecto óptico, toro longitudinal. Ampliação: A – 400×; B, C – Núcleos específicos, na medula oblongata, ao longo da comissura ventral rombencefálica. Ampliação: B – 400×; Ampliação: C – 400×; D, E – hipotálamo; Ampliação: D - 400×; E – Núcleo difuso do lobo inferior. Ampliação: E – 400×. F – tracto localizado por baixo do ventrículo rombencefálico, no griseu central. Ampliação: F – 400×.

Na região mais caudal do diencéfalo, por cima do corpo mamilar encontra-se ainda um grupo perfeitamente individualizado de células que hibridaram com a sonda 3OV1 (Figura 42D) e que se inserem numa região maioritariamente celular. Por último, todo o núcleo difuso do lobo inferior e o corpo mamilar apresentam uma reacção positiva à sonda 3OV1 embora não muito intensa.

Em posição ventral ao ventrículo rombencefálico estende-se um núcleo de células que apresentam sinal, embora um pouco disperso. Esta região, que parece ser o griseu central (Figura 42F), apresenta corpos celulares dispersos, onde se verifica o sinal específico. Este tracto celular parece continuar pela medula oblongata ao longo da comissura ventral rombencefálica.

4.3.3 EXPRESSÃO DA AROMATASE NO CÉREBRO DA FÊMEA

Nesta secção, à semelhança do que foi feito no ponto 4.3.2 serão apresentados numa

primeira fase, os esquemas dos diferentes cortes do cérebro, aos quais foram efectuadas as hibridações *in situ*. Estes esquemas (Figura 43) serão acompanhados por uma descrição resumida das principais regiões que podem ser individualizadas, sempre que estas ainda não tenham sido feitas na secção anterior. A localização destas áreas específicas é identificada para melhor reconhecimento das estruturas que revelaram a presença dos transcritos. A restante apresentação será feita como para o cérebro do macho.

A Figura 43 é composta por três secções longitudinais de um cérebro de uma fêmea adulta e sexualmente activa. Ao contrário do cérebro do macho, este cérebro não apresenta qualquer distorção e as estruturas podem ser identificadas com bastante mais precisão. Os cortes apresentados e identificados como A, B e C correspondem respectivamente a 1056 μ m, 2112 μ m e 2310 μ m de espessura a partir da periferia do tecido. Na primeira secção (Figura 43A) é possível observar na sua região mediana, o ventrículo tectal, delimitado antero-rostralmente pela zona cinzenta periventricular do tecto óptico, seguida pelo tecto óptico. O ventrículo é delimitado caudal e ventralmente pelo toro semicircular. Na região mais caudal do tecido podem identificar-se duas estruturas redondas que darão origem ao cerebelo. Ventralmente ao toro semicircular, situa-se o toro lateral e o núcleo difuso do lobo inferior, estruturas fundamentalmente celulares, à semelhança das anteriormente descritas, com excepção da região do cerebelo que parece ser maioritariamente axonal. Na região mais anterior do esquema, encontra-se representada a zona lateral da área dorsal telencefálica, mais uma vez uma região celular.

Cérebro de uma fêmea adulta

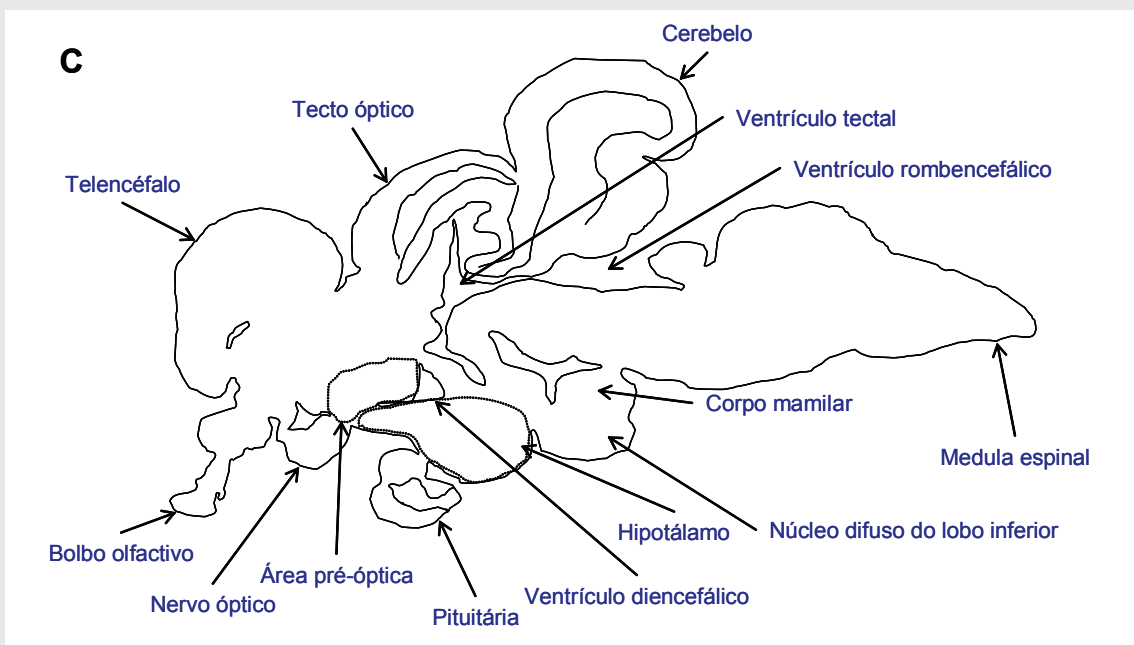
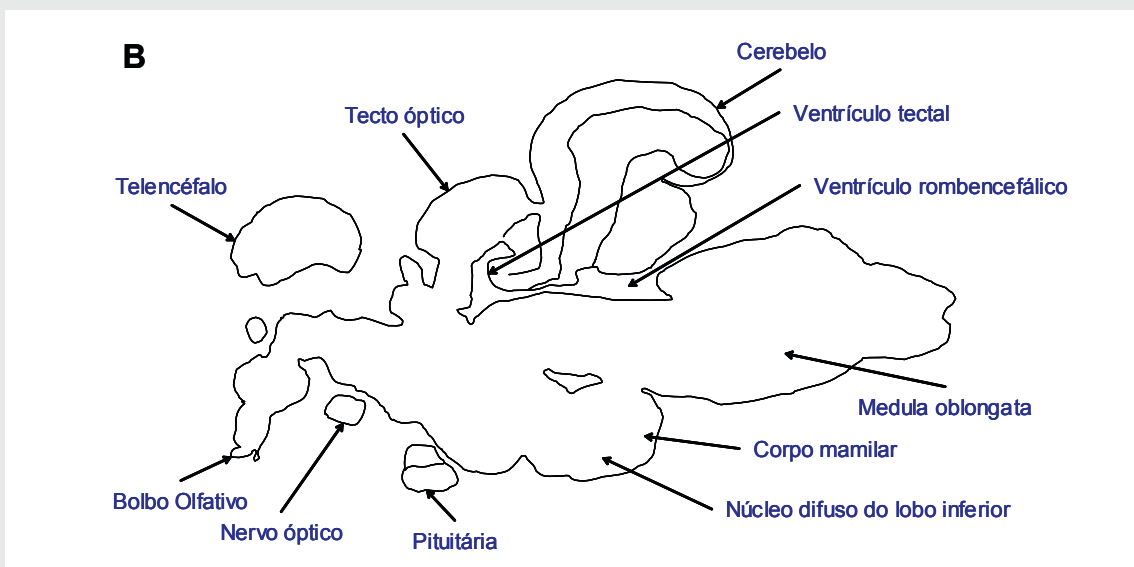
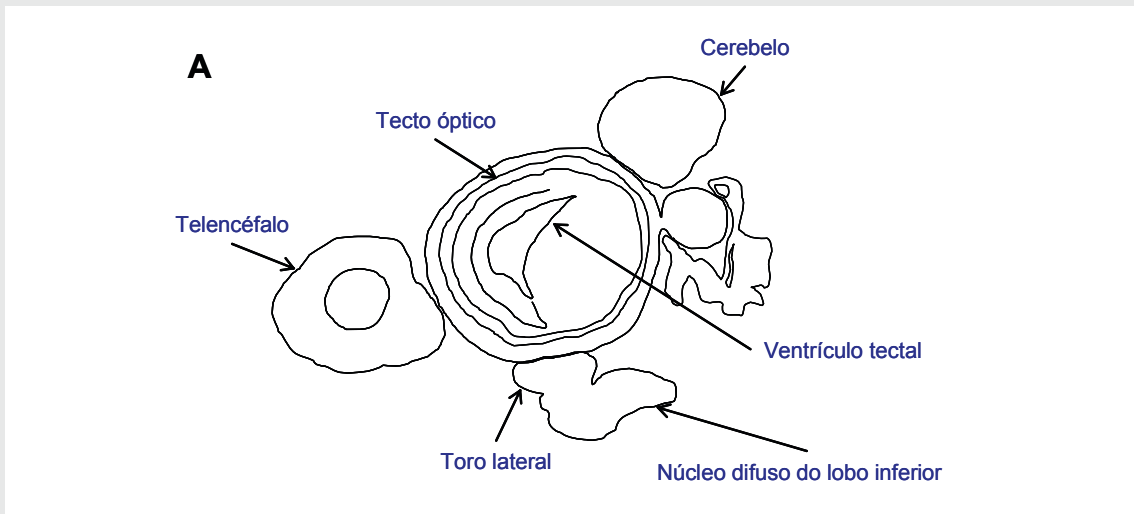


Figura 43 – Esquema de três cortes sagitais do cérebro de uma fêmea de *Oreochromis mossambicus*. As três imagens **A**, **B** e **C** correspondem respectivamente aos cortes 1056µm, 2112µm e 2310µm efectuados ao cérebro de uma fêmea, com espessuras de 11µm cada corte, sendo o último corte correspondente sensivelmente à zona sagital mediana do cérebro. Nos cortes encontram-se representadas algumas das regiões e das estruturas mais relevantes a este trabalho. É também indicado a ponteados a área pré-óptica e o hipotálamo, regiões bastante importantes pelas suas características neuroendócrinas e implicações na activação dos comportamentos sexuais.

A Figura 43B apresenta fundamentalmente as mesmas estruturas que Figura 43A. O telencéfalo, em que se podem observar na sua região mais dorsal a zona central da área dorsal telencefálica e ventralmente o bolbo olfactivo, ambas estruturas celulares, seguido pelo nervo olfactivo maioritariamente axonal. Imediatamente a seguir ao bolbo olfactivo, em posição caudal, o nervo óptico composto por fibras axoniais. Na Figura 43B continua a observar-se quer o tecto óptico, quer o cerebelo, embora já se consiga visualizar o corpo do cerebelo (*corpus cerebelli*), delimitado ventralmente pelo ventrículo rombencefálico. Em relação ao corte anterior surgem ainda duas estruturas que não estavam antes representadas: a medula oblongata e a pituitária. A Figura 43C correspondente ao corte com 2310µm coincide aproximadamente à região sagital mediana do cérebro da fêmea, o que pode ser observado pela localização da pituitária que inclusivamente apresenta a sua ligação ao hipotálamo. Neste esquema é ainda representada a localização aproximada do hipotálamo, que se desenvolve ventralmente em relação ao ventrículo diencefálico e que é delimitado dorso rostralmente pela área pré-óptica.

4.3.3.1 Expressão do gene *Cyp19B* no cérebro da fêmea

A Figura 44 corresponde ao corte mais periférico do cérebro da fêmea. Nele encontram-se as principais regiões e, delimitadas a azul, as áreas correspondentes às fotografias apresentadas na Figura 45. São ainda representadas a sombreado as duas regiões onde foi detectado sinal específico para a sonda F3BR3.

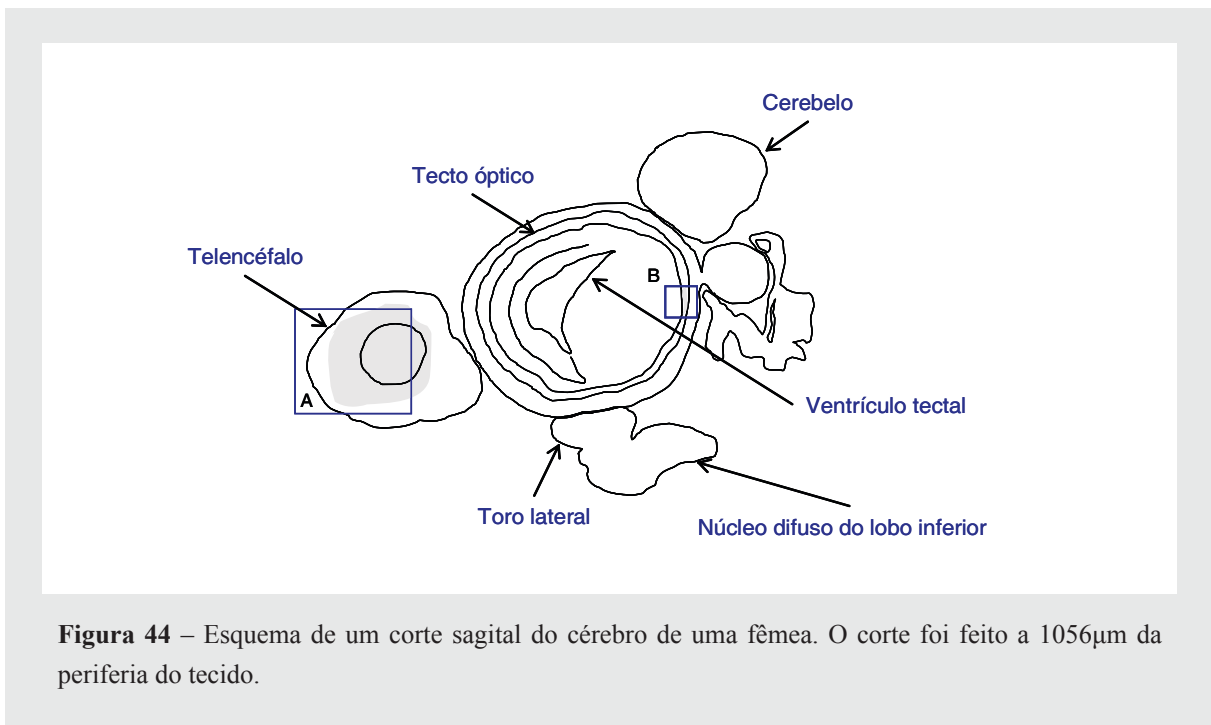


Figura 44 – Esquema de um corte sagital do cérebro de uma fêmea. O corte foi feito a 1056µm da periferia do tecido.

O telencéfalo tem um sinal em praticamente toda a sua área visível, correspondente à zona lateral da área dorsal telencefálica (Figura 45A). Esta área dorsal telencefálica é maioritariamente celular, como pode ser observado pela presença de núcleos (ver Figura 33B). Este sinal, embora específico, apresenta uma fraca intensidade, sobretudo quando comparado com o encontrado no tecto óptico, muito mais localizado e restrito a um núcleo muito restrito de células, mas com muito maior intensidade (Figura 45B).

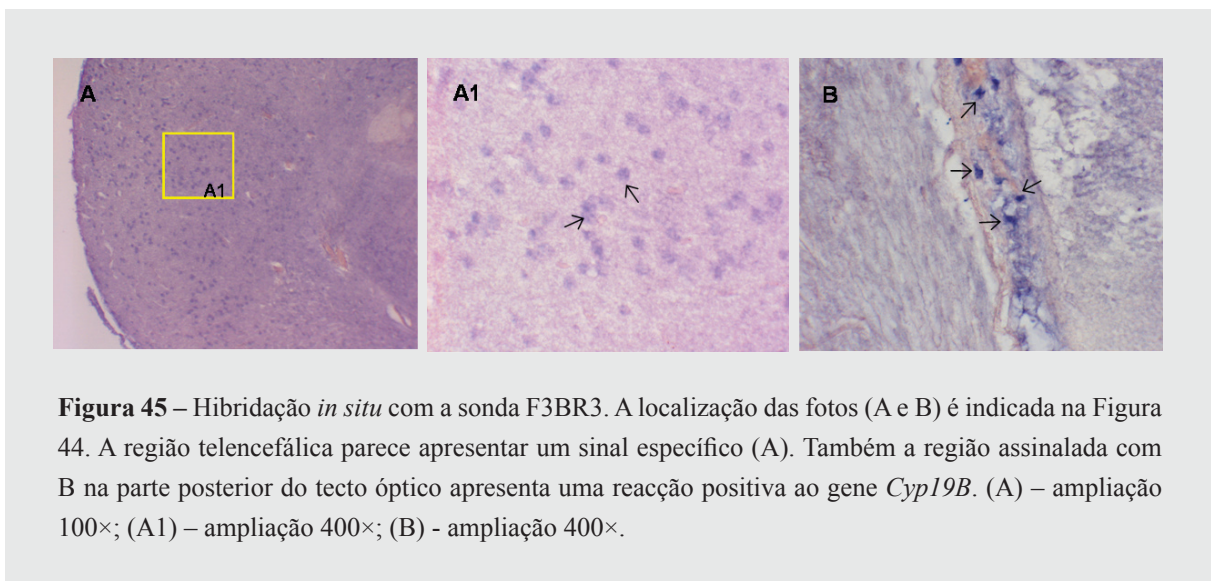


Figura 45 – Hibridação *in situ* com a sonda F3BR3. A localização das fotos (A e B) é indicada na Figura 44. A região telencefálica parece apresentar um sinal específico (A). Também a região assinalada com B na parte posterior do tecto óptico apresenta uma reacção positiva ao gene *Cyp19B*. (A) – ampliação 100×; (A1) – ampliação 400×; (B) - ampliação 400×.

A Figura 46 mostra o esquema do corte sagital do cérebro da fêmea a 2112µm da periferia do tecido e são delimitadas a sombreado as zonas onde foram encontradas as reacções positivas mais significativas à hibridação com a sonda F3BR3. Nesta secção foram detectados transcritos do gene *Cyp19B* em torno do ventrículo diencefálico (Figura 46A) numa região fundamentalmente celular, como já tinha sido detectado no cérebro do macho. Nesta região, a pericária das células nervosas parece dispor-se na região periventricular, enquanto que os axónios se projectam para a periferia, afastando-se do ventrículo. Em posição caudal em relação ao ventrículo diencefálico pode observar-se um núcleo celular bastante bem individualizado em cuja periferia parece expressar mRNA do *Cyp19B* (Figura 46B). As zonas onde são detectados os sinais parecem ser maioritariamente celulares. O mesmo acontece com os sinais representados na Figura 46D em que um pequeno conjunto de células revela um sinal positivo. Estas células situam-se na medula oblongata e a deposição de sinal parece fazer-se na região nuclear, uma vez que pode observar-se o citoplasma perfeitamente translúcido. No mesmo tracto celular, na medula oblongata em posição caudal às anteriores, pode verificar-se um outro núcleo com um sinal bastante claro, no que aparenta ser uma estrutura celular num meio maioritariamente axonal. Os restantes sinais com maior relevância localizam-se ao longo do corpo do cerebello, na sua periferia nas células de *Purkinje*, com uma grande densidade de corpos celulares (Figura 46H), e na área dorsal telencefálica (Figura 46G).

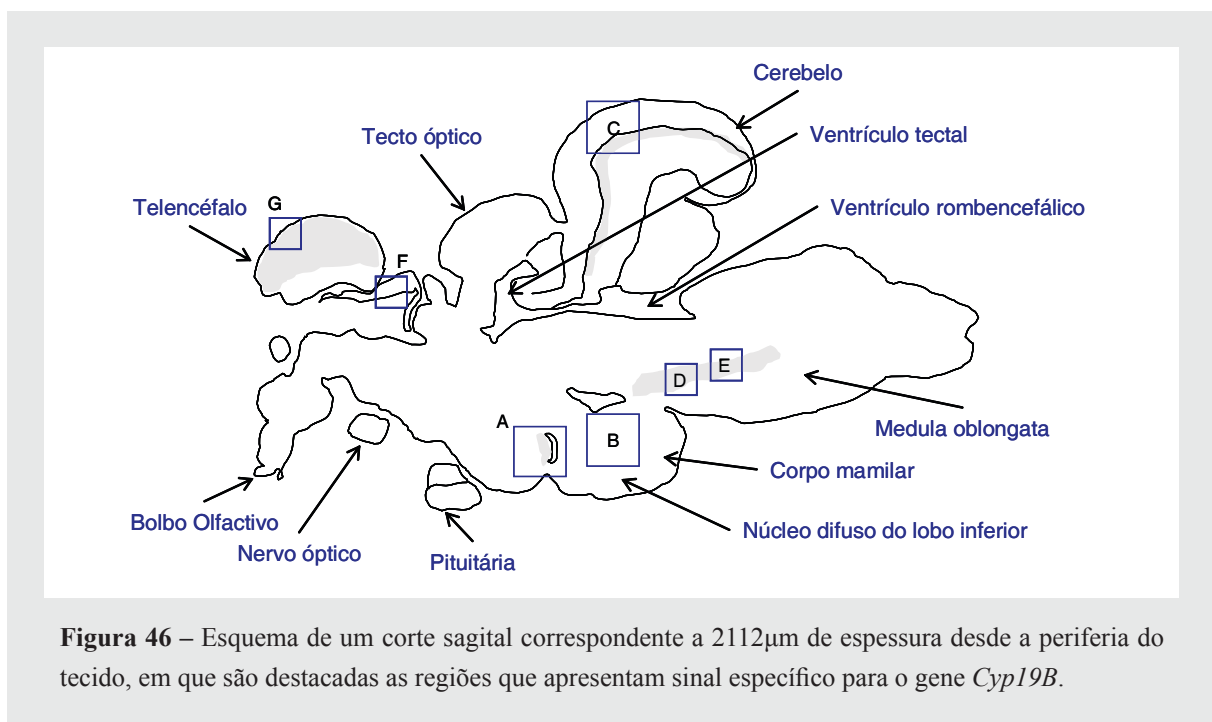


Figura 46 – Esquema de um corte sagital correspondente a 2112µm de espessura desde a periferia do tecido, em que são destacadas as regiões que apresentam sinal específico para o gene *Cyp19B*.

No corte sagital intermédio no cérebro da fêmea (Figura 46), é possível distinguir um sinal distribuído por diferentes regiões do cérebro, o que não acontecia numa região mais periférica ilustrada no corte anterior. Os sinais mais evidentes foram observados na pituitária (secção 4.3.4). Embora também evidentes, as restantes regiões revelaram uma reacção específica um pouco menos intensa. A Figura 47A ilustra uma concentração de células onde se observam transcritos do gene *Cyp19B*, localizadas em núcleos em torno do ventrículo diencefálico: em posição caudal ao ventrículo, no núcleo tuberal posterior, em posição rostral no núcleo tuberal anterior, e dorsoventralmente na zona dorsal do hipotálamo periventricular. As células que parecem apresentar o sinal mais intenso são exactamente as que se situam em torno do ventrículo.

Na Figura 47B pode observar-se um núcleo celular bem individualizado perto do corpo mamilar, no final do hipotálamo. Este sinal localiza-se quer na porção dorsal, quer na porção ventral do núcleo identificado (B2). Nesta secção é ainda de destacar a existência de sinais específicos no cerebelo, com o sinal a estender-se por toda a linha de células que delimita a região do corpo do cerebelo (*corpus cerebelli*) (Figura 47C). As células de *Purkinje* apresentam corpos celulares de grandes dimensões e com dendrites extremamente ramificadas. Também ao longo da medula oblongata (Figura 47D e E) podem ser observados transcritos da aromatase do cérebro em núcleos celulares específicos dispersos ao longo de um tracto celular (provavelmente no fascículo longitudinal mediano). No telencéfalo, ao longo de toda a área dorsal telencefálica, existe um sinal evidente, embora não tão intenso como o registado para os núcleos da medula e do ventrículo diencefálico (Figura 47G).

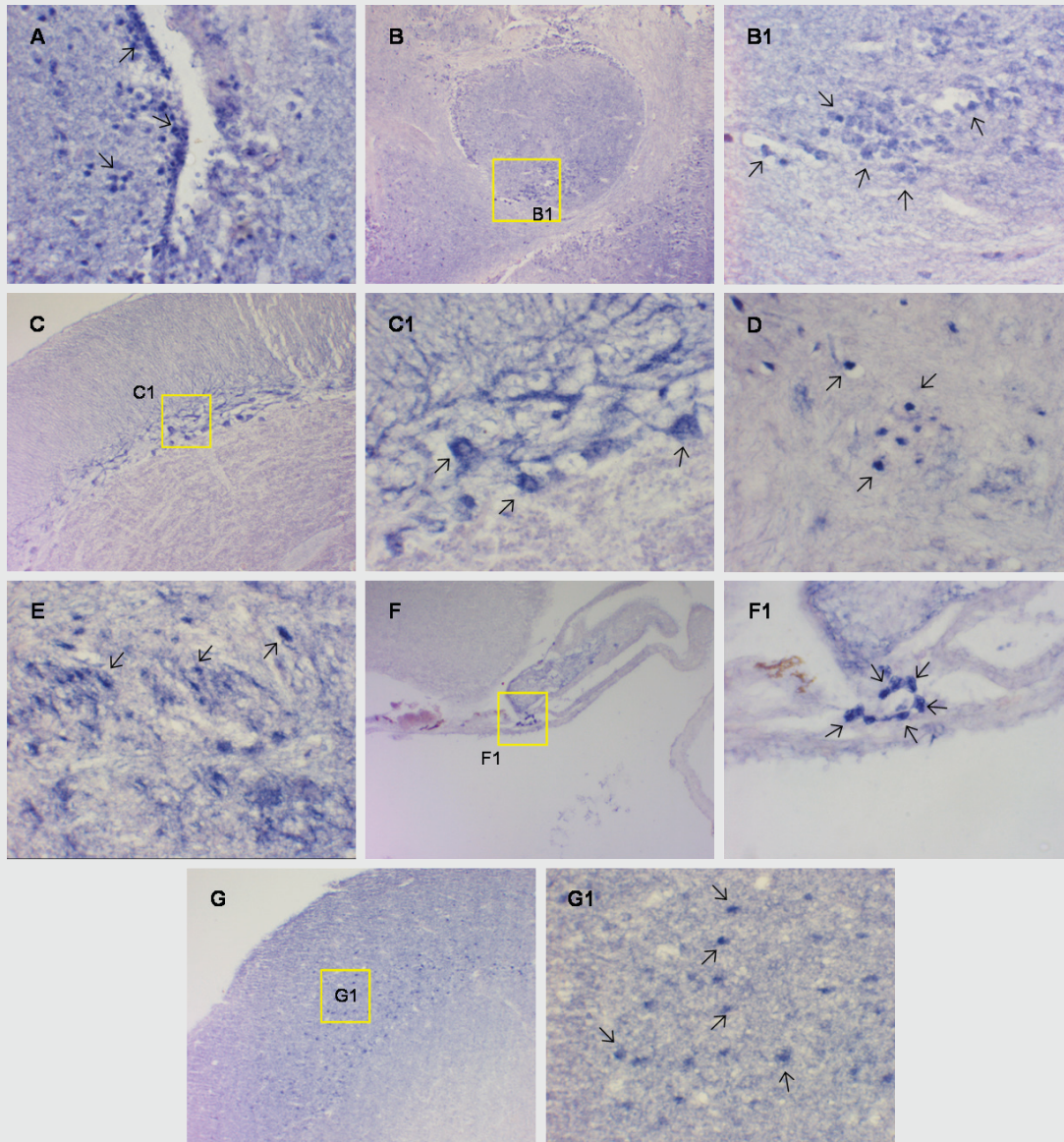


Figura 47 – Hibridação *in situ* com a sonda F3BR3 na secção sagital intermédia do cérebro de fêmea. Nesta região o sinal encontra-se disperso por diferentes regiões, com principal destaque para a região do hipotálamo (A e B), telencéfalo (F e G), cerebelo (C) e ainda na região da medula oblongata (D e E). (A) – ampliação 400×; (B) - ampliação 100×; (B1) – ampliação 400×; (C) – ampliação 100×; (C1) – ampliação 400×; (D) - ampliação 400×; (E) – ampliação 400×; (F) – ampliação 100×; (F1) – ampliação 400×; (G) – ampliação 100×; (G1) – ampliação 400×.

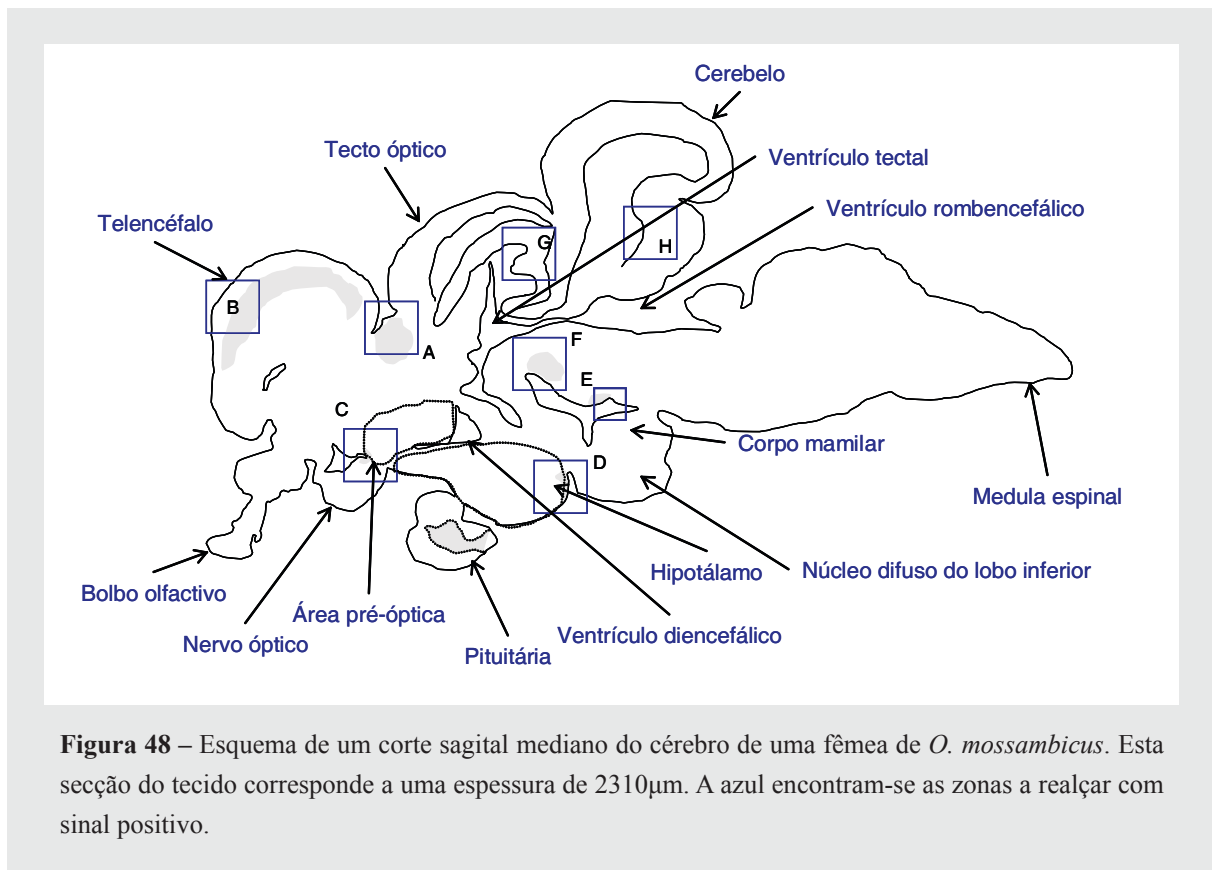


Figura 48 – Esquema de um corte sagital mediano do cérebro de uma fêmea de *O. mossambicus*. Esta secção do tecido corresponde a uma espessura de 2310µm. A azul encontram-se as zonas a realçar com sinal positivo.

A terceira secção sagital (Figura 48) em que o cérebro da fêmea foi amostrado, correspondente a 2310µm de espessura desde a periferia do tecido e corresponde sensivelmente à região mediana do cérebro. A área pré-óptica do hipotálamo situa-se rostralmente em relação ao ventrículo diencefálico e culmina anteriormente nos nervos ópticos. A caixa marcada com a letra A compreende a região da habénula e do tálamo dorsal. A habénula localiza-se no epitálamo e pode ainda ser dividida num núcleo dorsal e num núcleo ventral.

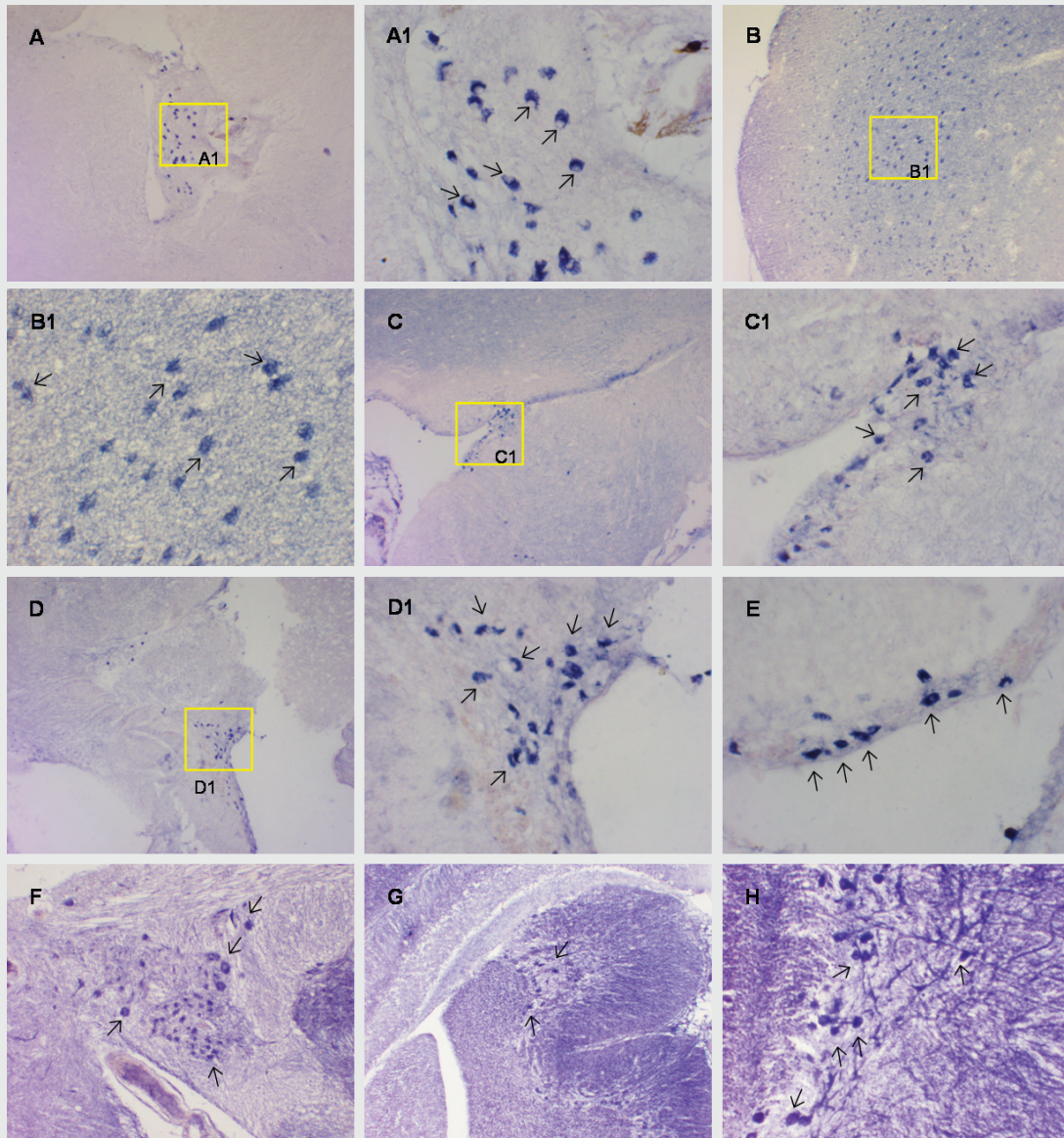


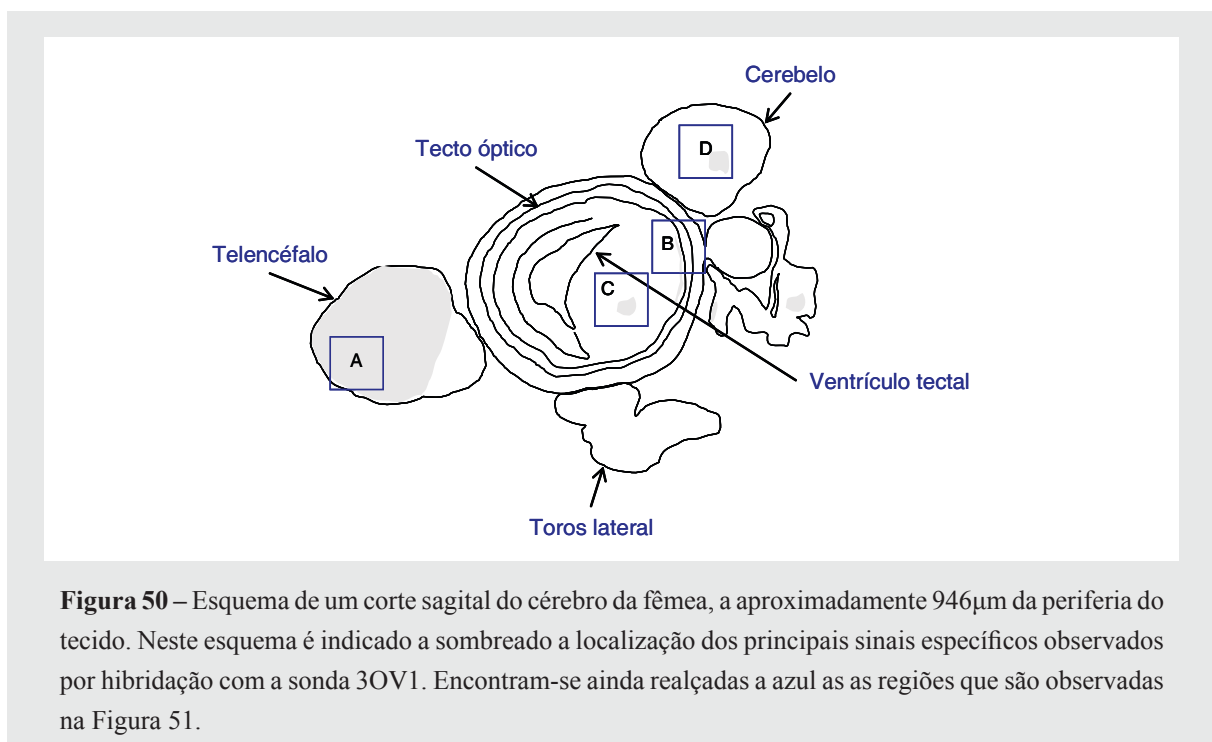
Figura 49 – Hibridação *in situ* com a sonda F3BR3 no cérebro da fêmea na terceira secção amostrada. Nas fotos A e A1 pode distinguir-se um sinal associado ao citoplasma de um núcleo celular na habénula, com a região nuclear não corada. O mesmo pode ser observado nas fotos C e C1 para a área pré-óptica do hipotálamo; a foto D representa a porção caudal do núcleo difuso do lobo inferior; as fotos E e F representam detalhes de núcleos dispersos na região anterior da medula oblongata ventralmente situados em relação ao cerebelo e as fotos G e H detalhes do tecto óptico e do lobo caudal do cerebelo, respectivamente. (A) – ampliação 100×; (A1) – ampliação 400×; (B) – ampliação 100×; (B1) – ampliação 400×; (C) – ampliação 100×; (C1) – ampliação 400×; (D) – ampliação 100×; (D1) – ampliação 400×; (E) – ampliação 400×; (F) – ampliação 100×; (G) – ampliação 100×; (H) – ampliação 100×;

A secção mediana é a que apresenta os sinais mais claros para a sonda F3BR3 na fêmea. A Figura 49 mostra um núcleo celular extremamente bem definido que corresponde sensivelmente à região habenular e ao tálamo dorsal. Em cortes adjacentes, o sinal que neste corte parece localizar-se na habénula, projecta-se para uma posição mais ventral e

ligeiramente recuada, atingindo o que parece ser o tálamo dorsal (Figura 49A). O sinal encontrado nestas células é claramente localizado no citoplasma (Figura 49A1). A área dorsal telencefálica apresenta um sinal claro e regular ao longo de todas as suas porções dorsal, central, lateral e posterior (Figura 49B). A região rostral da área pré-óptica do hipotálamo apresenta, também no citoplasma, um sinal localizado mas claro (Figura 49C). O sinal parece aqui estar localizado numa região maioritariamente celular. São encontrados transcritos do *Cyp19B* na porção mais caudal do núcleo difuso do lobo inferior, num pequeno conjunto de células localizado na região citoplasmática (Figura 49D). Podem ainda ser identificados sinais específicos na parte anterior da medula oblongata, ventralmente localizados em relação à porção mais rostral do cerebelo, que se estendem, embora de forma descontínua, para a região caudal pela medula oblongata (Figura 49E, F). Detecta-se também um sinal fraco perto do lobo caudal do cerebelo (Figura 49H).

4.3.3.2 Expressão do gene *Cyp19A* no cérebro da fêmea

A sonda 3OV1 foi hibridada com cortes adjacentes aos utilizados para a sonda anterior. A primeira secção corresponde a uma espessura total de tecido com cerca de 946µm.



A Figura 50 representa um corte da primeira secção, em que são indicadas as principais regiões onde foram detectados os transcritos do gene *Cyp19A*. À semelhança do já descrito para a Figura 44, neste esquema pode ser observada rostralmente a zona lateral da área dorsal telencefálica, estando definida a sombreado a região que apresenta sinal específico. Os restantes sinais são muito mais localizados e situam-se no toro semicircular, assinalados com as letras B e C, parecendo também haver uma reacção positiva no cerebelo (Figura 50D).

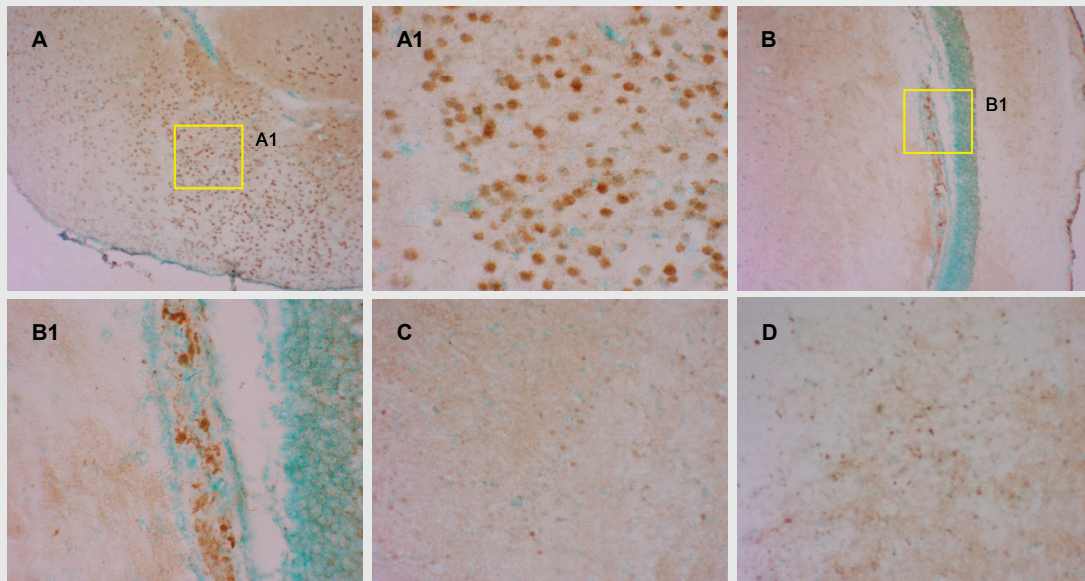


Figura 51 – Hibridação in situ com a sonda 3OVI na primeira secção do cérebro da fêmea amostrada. O corte corresponde a uma profundidade no tecido de 946 μ m. As fotos A e A1 correspondem a detalhes da zona lateral da área dorsal telencefálica, enquanto que os sinais apresentados em B e C correspondem ao toro semicircular; o sinal observado em D localiza-se no cerebelo. (A) – ampliação 100 \times ; (A1) – ampliação 400 \times ; (B) – ampliação 100 \times ; (B1) – ampliação 400 \times ; (C) – ampliação 100 \times ; (D) – ampliação 100 \times ;

Toda a zona lateral da área dorsal telencefálica apresenta uma reacção positiva que aparenta estar associada ao núcleo das células numa região maioritariamente celular e com uma grande intensidade de sinal (Figura 51A). Os restantes sinais são de intensidade bastante inferior e localizam-se dois deles no toro semicircular (Figura 51B e C). Por último, o cerebelo apresenta também um pequeno núcleo de células coradas positivamente, embora com uma intensidade muito fraca (Figura 51D).

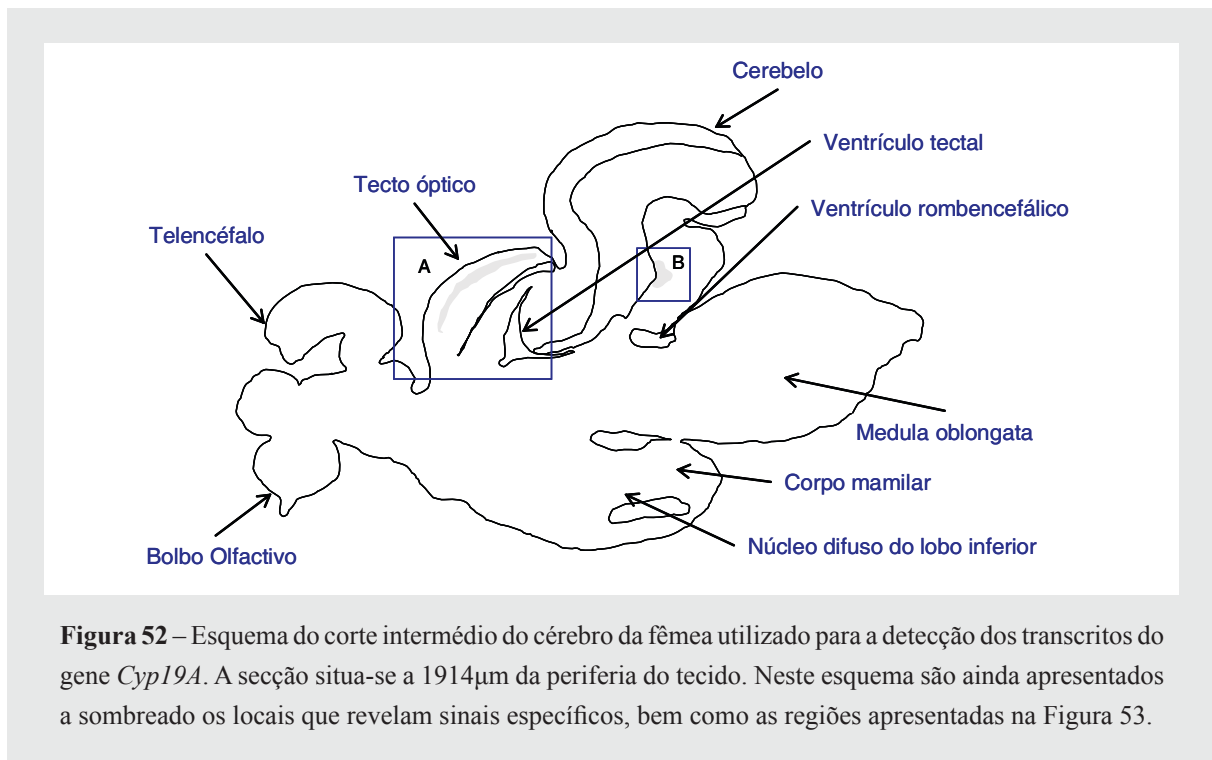


Figura 52 – Esquema do corte intermédio do cérebro da fêmea utilizado para a detecção dos transcritos do gene *Cyp19A*. A secção situa-se a 1914µm da periferia do tecido. Neste esquema são ainda apresentados a sombreado os locais que revelam sinais específicos, bem como as regiões apresentadas na Figura 53.

A segunda secção, a 1914µm, apresenta-se esquematizada na Figura 52. Nesta secção o mRNA para o gene *Cyp19A* foi detectado em duas zonas, embora com fraca intensidade.

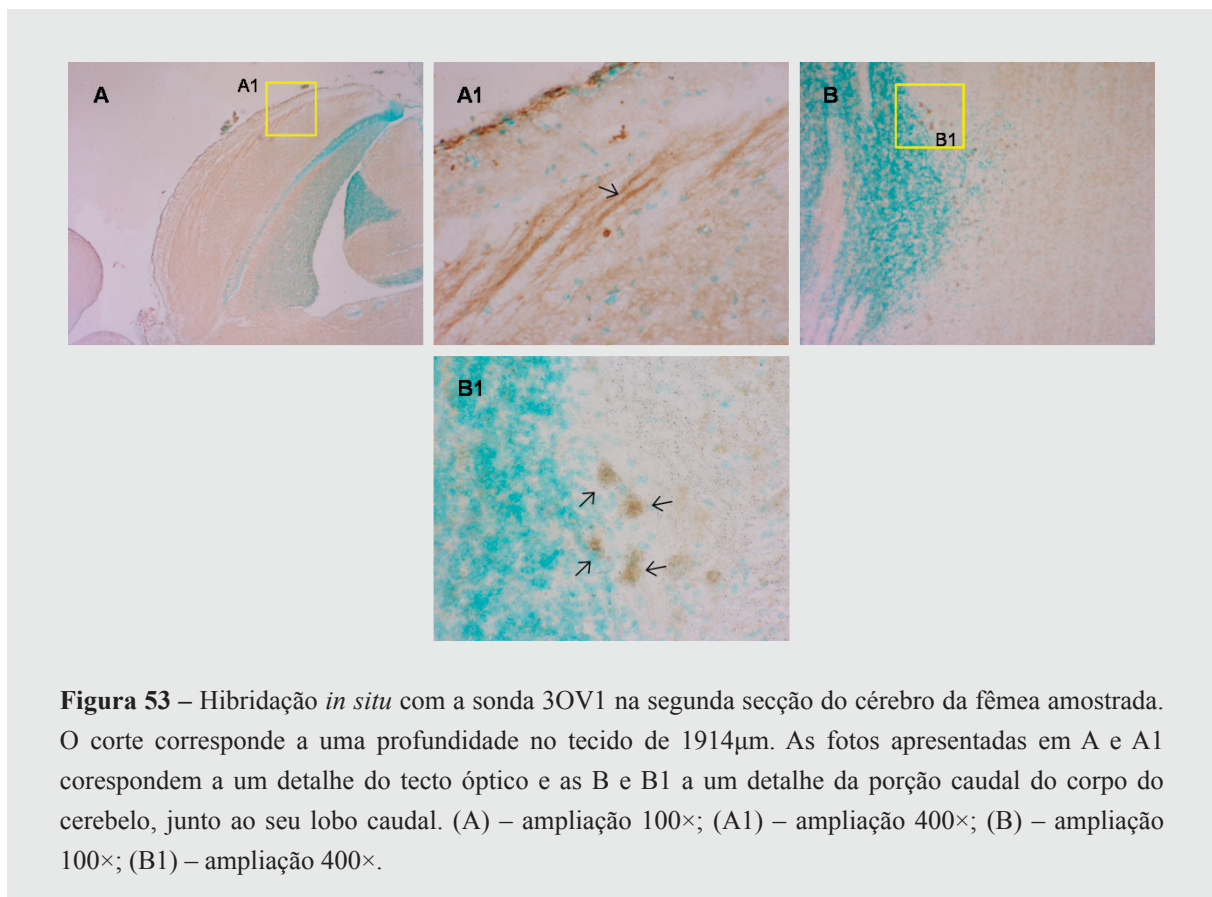


Figura 53 – Hibridação *in situ* com a sonda 3OV1 na segunda secção do cérebro da fêmea amostrada. O corte corresponde a uma profundidade no tecido de 1914µm. As fotos apresentadas em A e A1 correspondem a um detalhe do tecto óptico e as B e B1 a um detalhe da porção caudal do corpo do cerebelo, junto ao seu lobo caudal. (A) – ampliação 100×; (A1) – ampliação 400×; (B) – ampliação 100×; (B1) – ampliação 400×.

A Figura 53 apresenta os sinais da hibridação de 3OV1 encontrados para a segunda secção (1914 μ m). Os transcritos localizam-se fundamentalmente no tecto óptico, na sua camada mais dorsal (Figura 53A). Observou-se também uma hibridação num grupo de células na periferia do corpo do cerebelo, em posição caudal e densamente celular (Figura 53B). Foi ainda possível detectar em algumas regiões uma estrutura membranar unicelular que aparenta também deposição de sinal específico.

A terceira secção hibridada encontra-se esquematizada na Figura 54. Este corte corresponde a uma espessura de tecido com 2332 μ m. Os sinais individualizados encontram-se maioritariamente na pituitária, no cerebelo e na medula oblongata, no tecto óptico e na parte frontal da área pré-óptica do hipotálamo. Foram detectadas nove regiões com sinal específico identificadas com letras de A a H. O sinal registado em A não será apresentado uma vez que se localiza numa estrutura membranar localizada rostralmente ao nervo óptico e que parece formada por células de grandes dimensões.

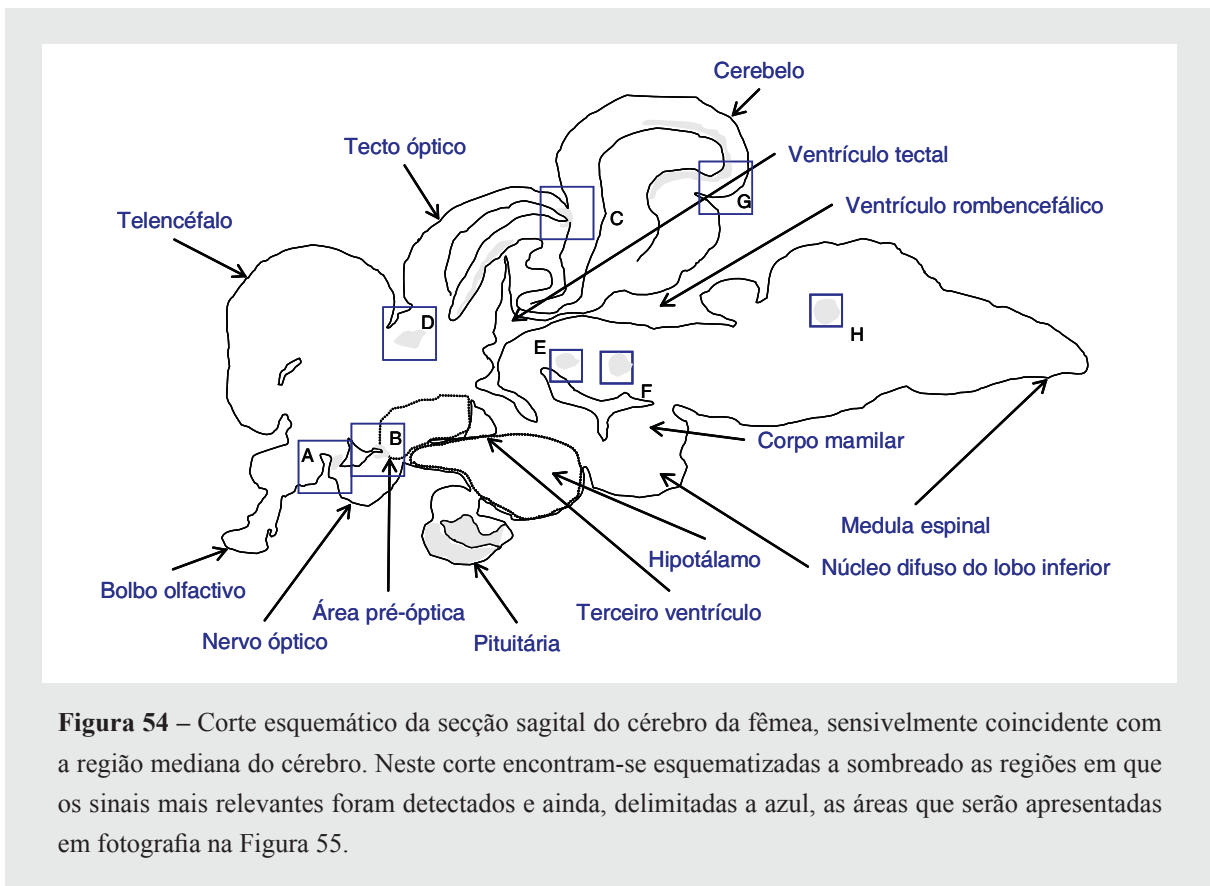


Figura 54 – Corte esquemático da secção sagital do cérebro da fêmea, sensivelmente coincidente com a região mediana do cérebro. Neste corte encontram-se esquematizadas a sombreado as regiões em que os sinais mais relevantes foram detectados e ainda, delimitadas a azul, as áreas que serão apresentadas em fotografia na Figura 55.

Os sinais individualizados na figura anterior são apresentados na Figura 55. Na região B1, o sinal localiza-se num núcleo de células de grandes dimensões junto ao início do nervo óptico. A Figura 55C centra-se na região caudal da zona cinzenta periventricular do tecto óptico. Também ao longo do corpo do cerebello, existe um sinal associado às células de *Purkinje* que contornam toda esta estrutura (Figura 55G). Os restantes sinais (Figura 55E, F e H) localizam-se ao longo da medula oblongata, no que parece ser um tracto celular que vai exibindo sinal em núcleos específicos e individualizados de células ao longo de toda esta estrutura. Estes sinais são localizados e caracterizam-se por estar presentes em grupos de células com grandes dimensões.

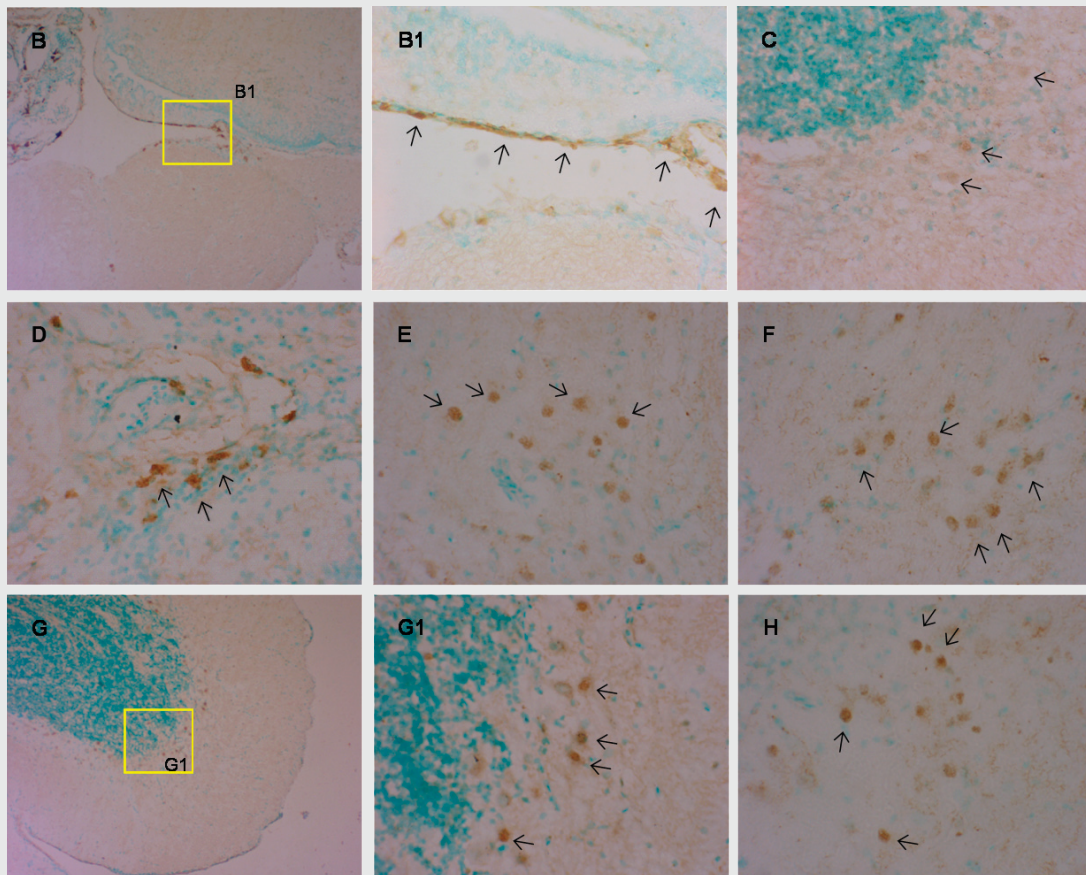


Figura 55 – Hibridação *in situ* com a sonda 3OV1 na segunda secção do cérebro da fêmea amostrada. O corte corresponde a uma profundidade no tecido de 2332 μ m. A foto apresentada em B (e B1) corresponde à região rostral da área pré-óptica do hipotálamo, junto ao nervo óptico; a foto C localiza-se na região caudal da zona cinzenta periventricular do tecto óptico; a caixa apresentada com a letra D na Figura 54 não é apresentada por pouca clareza no sinal obtido; As fotos marcadas como E, F e H correspondem a núcleos de células localizados ao longo da medula oblongata; A foto indicada com a letra G apresenta a região caudal do corpo do cerebello. (B) – ampliação 100 \times ; (B1) – ampliação 400 \times ; (C) – ampliação 400 \times ; (E) – ampliação 400 \times ; (F) – ampliação 400 \times ; (G) – ampliação 100 \times ; (G1) – ampliação 400 \times ; (H) – ampliação 400 \times .

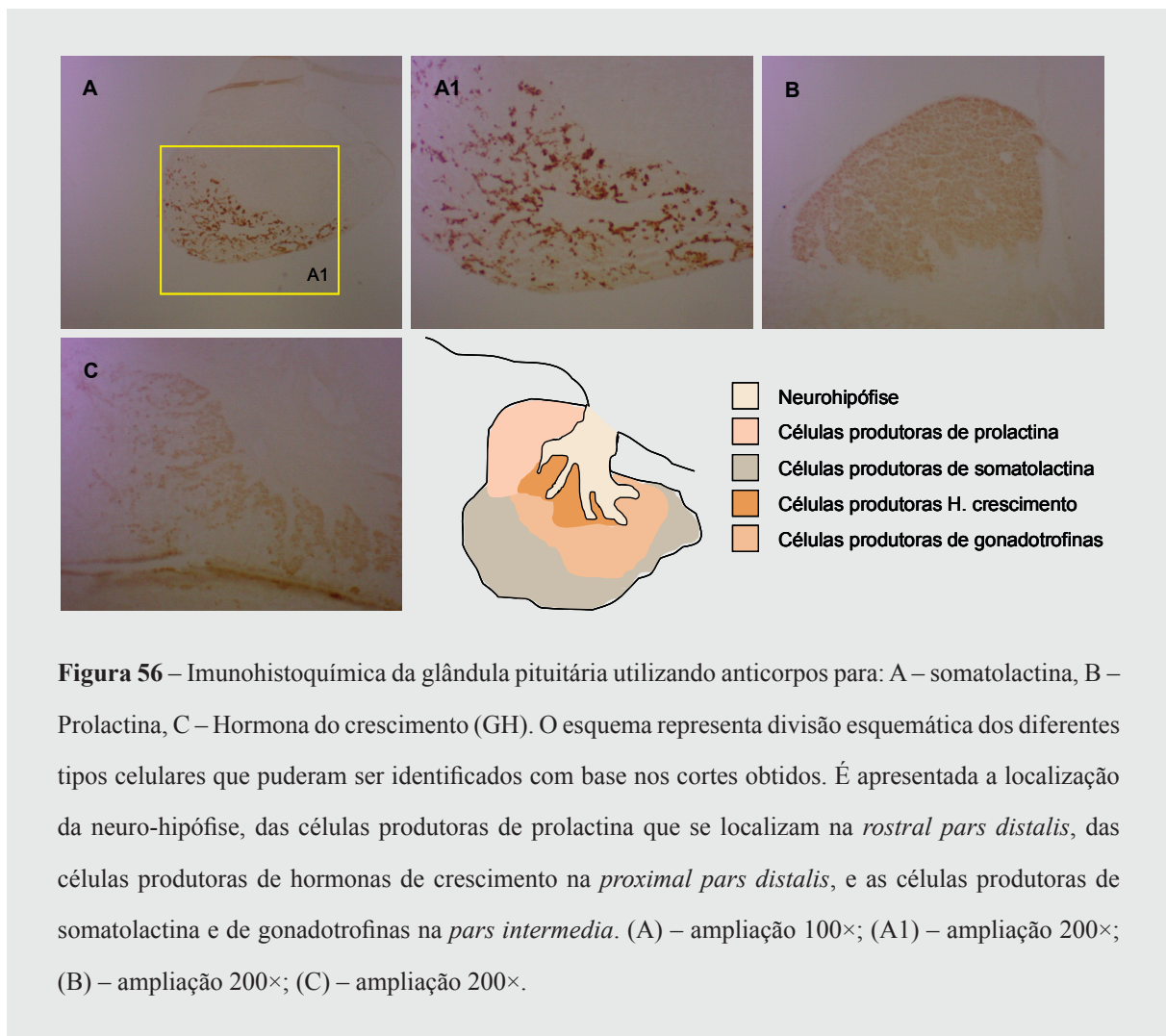
Neste corte puderam ainda ser identificadas outras regiões que apresentaram alguma coloração específica. No telencéfalo, por exemplo, mais uma vez foi observado um sinal embora fraco. Toda a região do toro longitudinal parece revelar também um sinal regular embora discreto (não apresentados na figura).

4.3.4 EXPRESSÃO DA AROMATASE NA PITUITÁRIA DE *O. MOSSAMBICUS*

Embora em algumas situações a pituitária possa aparecer em mais do que um corte, apenas será feita uma comparação baseada nos cortes centrais desta glândula. Assim, será apresentado um esquema com as localizações dos sinais específicos para cada gene em cada sexo, após o que serão apresentadas as fotografias referentes às regiões que revelaram os sinais mais significativos. A pituitária (ou hipófise) é constituída fundamentalmente por três regiões. A adeno-hipófise, geralmente situada em posição mais rostral; a neuro-hipófise em posição posterior e ainda a *pars intermédia* que se situa na fronteira entre as duas. A adeno-hipófise foi a única região em que foi possível detectar sinal para qualquer um dos genes em ambos os sexos.

4.3.4.1 Imunohistoquímica

Com o objectivo de identificar quais as células em que foram verificados os sinais específicos para a aromatase, foram elaborados alguns testes de imunohistoquímica utilizando anticorpos específicos para a hormona do crescimento (GH), prolactina (PRL) e somatolactina (SL) de dourada.



Os anticorpos foram testados apenas no cérebro do macho, uma vez que não era esperado dimorfismo sexual na expressão destas hormonas na hipófise. Na Figura 56A é apresentado a reacção com o anticorpo para a somatolactina. A imunoactividade para esta hormona encontra-se na região ventral *pars distalis* da adeno-hipófise num grupo de células muito bem individualizado. Na Figura 56B é mostrado o núcleo celular responsável pela produção da prolactina e que se localiza na região anterior da *pars distalis* da adeno-hipófise, e a imunoactividade para a hormona de crescimento localiza-se também na *pars distalis* da adeno-hipófise, mas na sua região posterior, na fronteira com a neuro-hipófise (Figura 56C).

4.3.4.2 Hibridação *in situ* na pituitária para ambos os genes *Cyp19*

A Figura 57 representa um corte esquemático da pituitária do macho. Neste esquema são representadas a sombreado, as regiões em que foram observados sinais específicos para cada um dos genes. Deste modo pode ser estabelecida uma comparação entre as distribuições dos dois genes nesta estrutura. As diferentes intensidades de sinal são representadas pela intensidade do sombreado nas diferentes regiões.

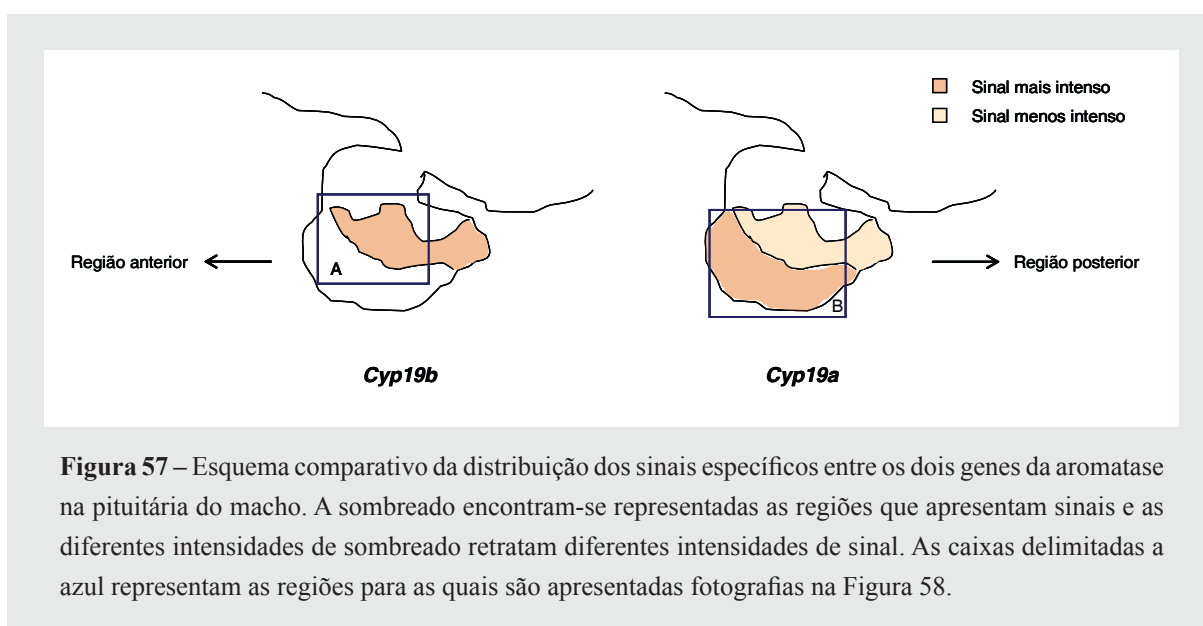


Figura 57 – Esquema comparativo da distribuição dos sinais específicos entre os dois genes da aromatase na pituitária do macho. A sombreado encontram-se representadas as regiões que apresentam sinais e as diferentes intensidades de sombreado retratam diferentes intensidades de sinal. As caixas delimitadas a azul representam as regiões para as quais são apresentadas fotografias na Figura 58.

Todos os sinais obtidos para ambos os genes e sexos localizam-se na adeno-hipófise. O sinal dos transcritos do gene *Cyp19B* situa-se fundamentalmente na região mais próxima da neuro-hipófise, sensivelmente na mesma zona das células somatotróficas e gonadotróficas (produtoras respectivamente de GH e hormonas gonadotróficas – GTH). A Figura 58A e A1 permitem observar a fronteira entre a adeno e a neuro-hipófise que se encontra bem marcada pelo sinal específico produzido pelos transcritos deste gene. O sinal registado para o gene *Cyp19A* de forma mais clara parece distribuir-se num conjunto de células localizadas ventralmente em relação às que apresentaram reacção positiva para o *Cyp19B*. Situa-se na região ventral da adeno-hipófise no grupo de células produtoras de somatolactina (Figura 58B). No entanto, o *Cyp19A* parece ainda apresentar alguma expressão, embora pontual, na região deferida para o gene anterior. Parece haver algumas

células específicas que se distribuem nesta zona e os sinais são identificados com a ajuda de setas colocadas por cima das fotos Figura 58B1.

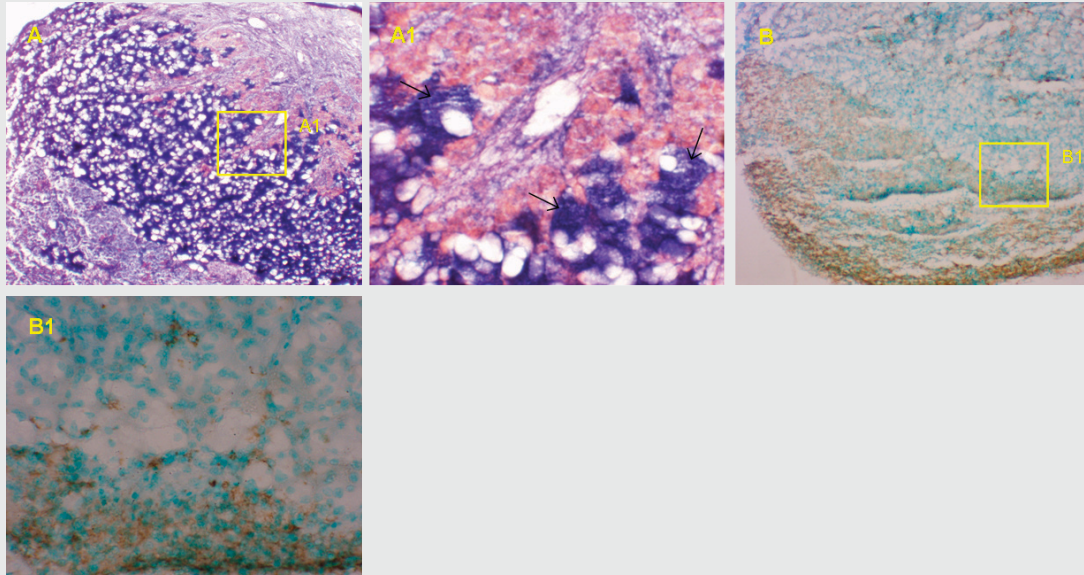


Figura 58 – Hibridação *in situ* com as sondas F3BR3 e 3OV1 na pituitária no macho de *O. mossambicus*. A e A1 – sinais obtidos com a sonda F3BR3; B e B1 – sinais obtidos com a sonda 3OV1. (A) – ampliação 400×; (A1) – ampliação 1000×; (B) – ampliação 400×; (B1) – ampliação 1000×.

Na Figura 59 são apresentadas a sombreado as distribuições dos sinais para cada gene na pituitária da fêmea. Na distribuição dos genes as diferentes intensidades indicam diferentes níveis de expressão nas diferentes regiões. Neste esquema são ainda realçadas a azul as regiões para as quais serão apresentadas fotografias em seguida.

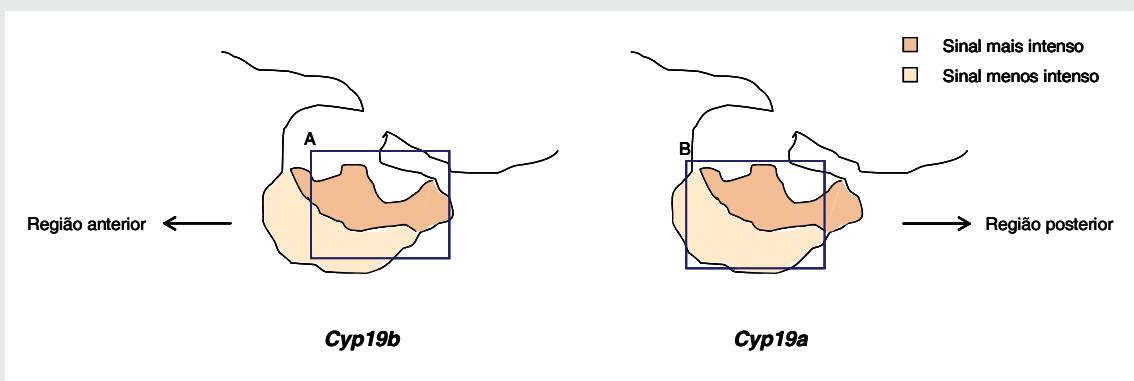


Figura 59 – Comparação dos sinais específicos entre os dois genes na pituitária da fêmea.

À semelhança do que se passou no cérebro do macho, os sinais encontrados na pituitária foram claramente os sinais mais expressivos. A velocidade da reacção foi inequivocamente maior na pituitária do que em qualquer outra região do tecido amostrado. Com destaque para o gene *Cyp19B*, a intensidade e a velocidade da reacção foi sistematicamente nesta glândula superior às restantes regiões do tecido nervoso. Por exemplo quer na fêmea quer no macho, sempre que uma secção da pituitária estava presente, o sinal começava a evidenciar-se nesta glândula ao fim de aproximadamente 20 minutos de reacção. Os restantes sinais foram deixados a revelar por períodos compreendidos entre as 2 e as 6 horas.

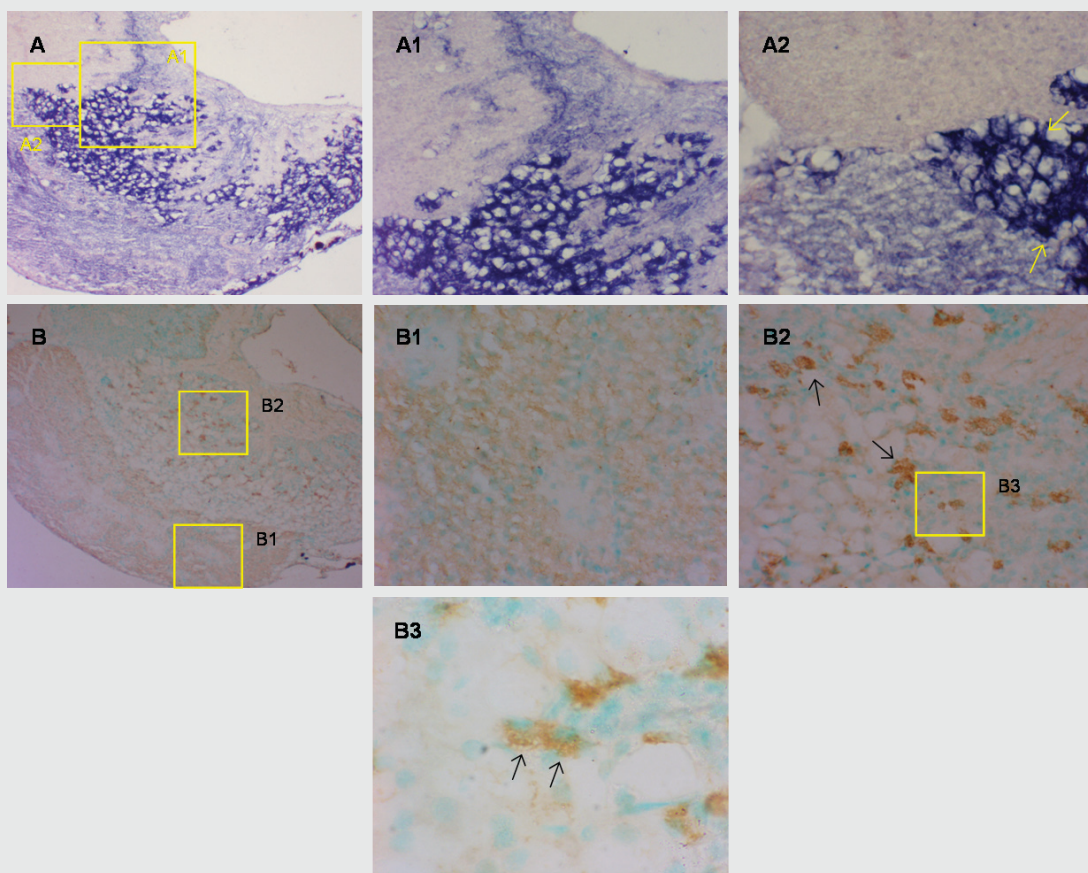


Figura 60 – Hibridação *in situ* com as sondas F3BR3 e 3OV1 na pituitária da fêmea de *O. mossambicus*. (A) – ampliação 200×; (A1) – ampliação 400× (A2) – ampliação 1000× (B) – ampliação 200×; (B1) - ampliação 400×; (B2) – ampliação 400×; (B3) - ampliação 1000×.

O padrão de distribuição dos transcritos para os dois genes parece ser idêntico em ambos os sexos, embora o *Cyp19A* pareça ter a intensidade invertida entre machos e fêmeas. Neste caso é possível observar uma região específica para o gene *Cyp19B*, mais uma

vez coincidente com as células produtoras de GH (Figura 60A). Nestas fotos consegue claramente observar-se o sinal depositado na região citoplasmática, podendo o núcleo ser individualizado a branco por falta de marcação. A distribuição do gene *Cyp19A* na pituitária da fêmea faz-se maioritariamente nas células produtoras de GH (Figura 60B), embora possa ser observado um sinal pontual mas intenso também nas células somatolactotróficas (Figura 60B1).

4.3.5 CONTROLO NEGATIVO

Neste capítulo foram realizados dois controlos negativos para demonstrar a especificidade das sondas. Um deles foi realizado sem a presença de qualquer sonda (Figura 61A), e no segundo o RNA presente nos tecidos, foi hidrolisado enzimaticamente (Figura 61C).

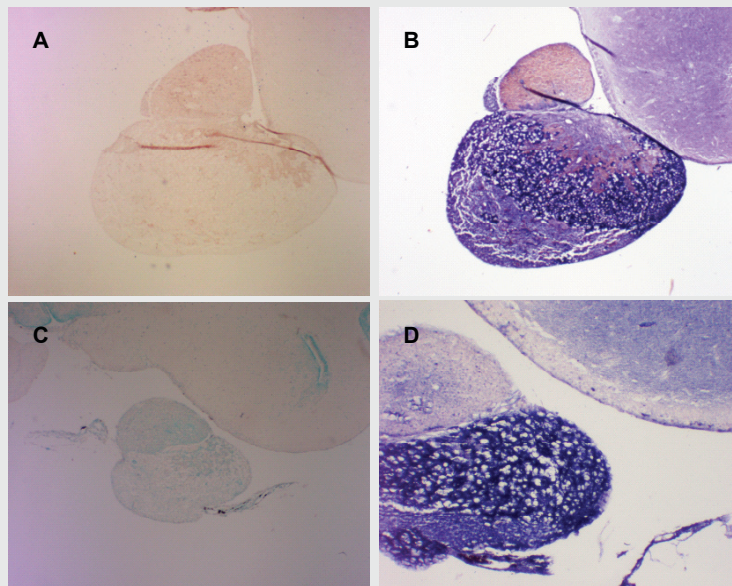


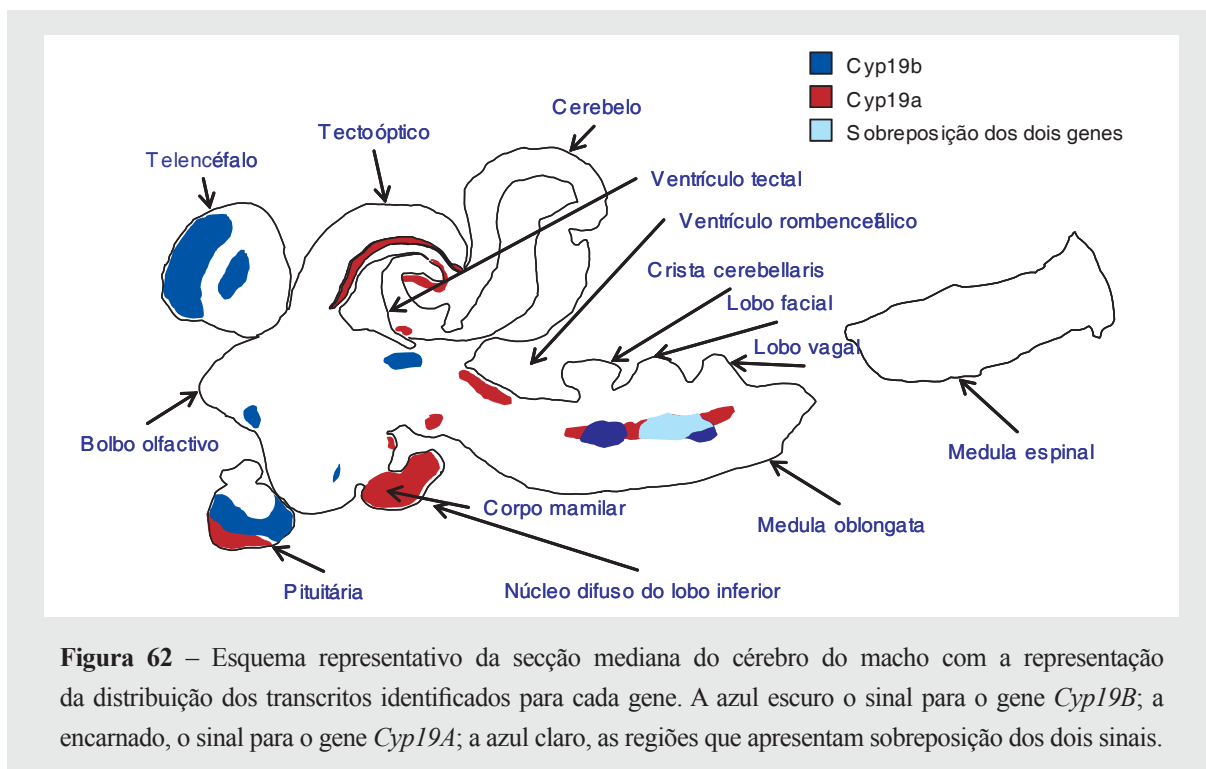
Figura 61 – Controlos negativos. As fotos A e C expressam dois controlos negativos diferentes; em A, o controlo foi feito não utilizando sonda; em B, o controlo foi feito utilizando Rnase como tratamento. Ao lado de cada uma destas fotos, encontram-se também cortes já apresentados da mesma região, mas com sinal específico para a sonda F3BR3 para que possa ser estabelecida uma comparação. (A) – ampliação 100×; (B) – ampliação 100× (C) – ampliação 40× (D) – ampliação 100×.

4.4 DISCUSSÃO

Os diferentes grupos de vertebrados desenvolveram as suas capacidades de acordo com o estilo de vida que adoptaram, com o ambiente e com as diferentes necessidades inerentes ao seu desenvolvimento. De acordo com as características das diferentes espécies e com o tipo de ambiente que as rodeia, associado às necessidades de sobrevivência específicas, o cérebro dos vários grupos sofreu desenvolvimentos particulares. As diferentes regiões cerebrais foram ou desenvolvidas ou atrofiadas, para fornecer uma melhor resposta às necessidades de cada espécie. Nos peixes, em espécies cujas estratégias de reprodução e de sobrevivência em geral assentam na comunicação química mediada pelo olfacto, é de esperar que apresentem o tracto e os lobos olfactivos mais desenvolvidos. Por outro lado, indivíduos que dependem essencialmente de estímulos visuais, para o cumprimento das suas funções vitais, terão desenvolvido particularmente o tecto óptico. Estas são algumas das macro-áreas em que puderam ser identificados sinais específicos claros para pelo menos um dos dois genes em estudo. O cérebro da tilápia apresenta, na sua anatomia geral, a mesma morfologia que o do peixe zebra, razão pela qual a identificação das localizações dos sinais foi feita com base no atlas do cérebro deste vertebrado (Wullimann *et al.*, 1996). Algumas destas regiões estão relacionadas com a activação de diferentes tipos de comportamentos em vertebrados, nomeadamente dos comportamentos sexuais. Na tilápia os comportamentos de corte e de cuidados parentais são bastante elaborados. O comportamento de corte é fundamentalmente guiado pelo macho que o leva a cabo após a construção de um ninho. O macho inicia a sequência elaborando um convite à fêmea e todo o ritual é composto por um conjunto de unidades de comportamento que visam orientar a fêmea para o ninho onde esta depositará os ovos (etograma da espécie em Oliveira, 1995). Alguns autores referem ainda que estes comportamentos de corte elaborados pelo macho são acompanhados de vocalizações (Lanzing, 1974; Amorim *et al.*, 2003; Amorim & Almada, 2005), embora estas ainda não tenham sido associadas ao desempenho dos comportamentos sexuais de forma clara. Após a entrada no ninho, a fêmea deposita os ovos que são em seguida recolhidos com a boca. Este processo implica que a fecundação ocorra já na boca da fêmea e a postura mantém-se permanentemente

dentro da boca da mãe até que adquira capacidade natatória e ainda ocasionalmente até que deixe de necessitar de protecção. Além de protecção, com este comportamento a fêmea garante uma contínua oxigenação da postura praticando movimentos mastigatórios com as mandíbulas. Este conjunto de comportamentos acontecem quando as fêmeas se encontram sexualmente receptivas e prestes a emitir a postura, processo que ocorre no culminar do seu ciclo sexual (ver Capítulo 2). Os comportamentos sexuais e de cuidados parentais são controlados por alguns dos núcleos cerebrais que expressam aromatase na tilápia e que foram detectados neste trabalho.

A distribuição dos genes *Cyp19B* e *Cyp19A* no cérebro do macho da tilápia moçambicana é complementar e existem algumas regiões em que os genes são expressos em conjunto. No entanto, a intensidade da expressão difere e em geral o *Cyp19B* é mais intenso do que o *Cyp19A* (Figura 62). Ambos os genes que codificam aromatase, e que por esta razão são responsáveis pela aromatização central de androgénios a estrogénios, distribuem-se de forma a produzir dois tractos no cérebro: um que se divide entre o telencéfalo dorsal e que se projecta para o diencéfalo, mais especificamente para o hipotálamo; e um outro que se estende desde o tecto óptico e se projecta caudalmente ao longo da medula oblongata. No caso da fêmea, os sinais parecem mais localizados do que no macho, embora as regiões que expressam aromatase sejam fundamentalmente idênticas.



Os bolbos olfactivos (BO) são importantes na mediação dos estímulos olfactivos que podem estar envolvidos na reprodução. Nos teleósteos, o gene *Cyp19B* é expresso nestas estruturas como acontece no peixe zebra (Chiang *et al.*, 2001a; Tong *et al.*, 2001a; Goto-Kazeto *et al.*, 2004) e na garoupa (*Epinephelus coioides*) (Zhang *et al.*, 2004), embora alguns autores refiram que o sinal se localiza apenas nas células da glia (Menuet *et al.*, 2005). Na tilápia não foi possível identificar este sinal com clareza: no macho pelo facto da localização destas estruturas não ser clara; na fêmea porque o sinal detectado parece estar associado apenas às regiões axoniais e com pouca intensidade para ambos os genes. Embora neste trabalho se tenha optado por não considerar os sinais associados a estruturas axoniais, a aromatase foi já identificada nos sinaptossomas, nos axónios e nos terminais axoniais pré-sinápticos (Naftolin *et al.*, 1996; Balthazart *et al.*, 1991; Saldanha *et al.*, 2000), podendo esta ser importante na produção de estradiol para a mediação das funções sinápticas (Saldanha *et al.*, 2000). A área dorsal telencefálica, onde foram detectados o *Cyp19B* nos machos e ambos os genes nas fêmeas, encontra-se ligada ao diencéfalo por diferentes tractos celulares, recebendo ainda projecções dos BO (Wullimann *et al.*, 1996). Diversos trabalhos referem o telencéfalo juntamente com a área pré-óptica, como uma das regiões com maior actividade para a aromatase em peixes (exemplo em Schlinger *et al.*, 1999). A presença de células imunorreactivas à aromatase também já tinha sido detectada em grande quantidade no telencéfalo de algumas aves (Schlinger & Arnold, 1991; Shen *et al.*, 1995). Nestas, os núcleos de controlo do canto, presentes no telencéfalo, apresentam uma elevada imunoreactividade à aromatase (Saldanha *et al.*, 2000; Saldanha & Coomaringam, 2005) indicando uma regulação do controlo do canto e da reprodução, por parte das hormonas esteróides. Também os peixes como a tilápia apresentam comportamentos de produção de sons durante os rituais de acasalamento (Amorim & Almada, 2005), pelo que a presença de mRNA de ambos os genes produtores de P450-aromatase no telencéfalo, e a consequente produção de estradiol, pode indicar que estes genes estejam envolvidos na produção de sons durante os comportamentos de acasalamento também nesta espécie.

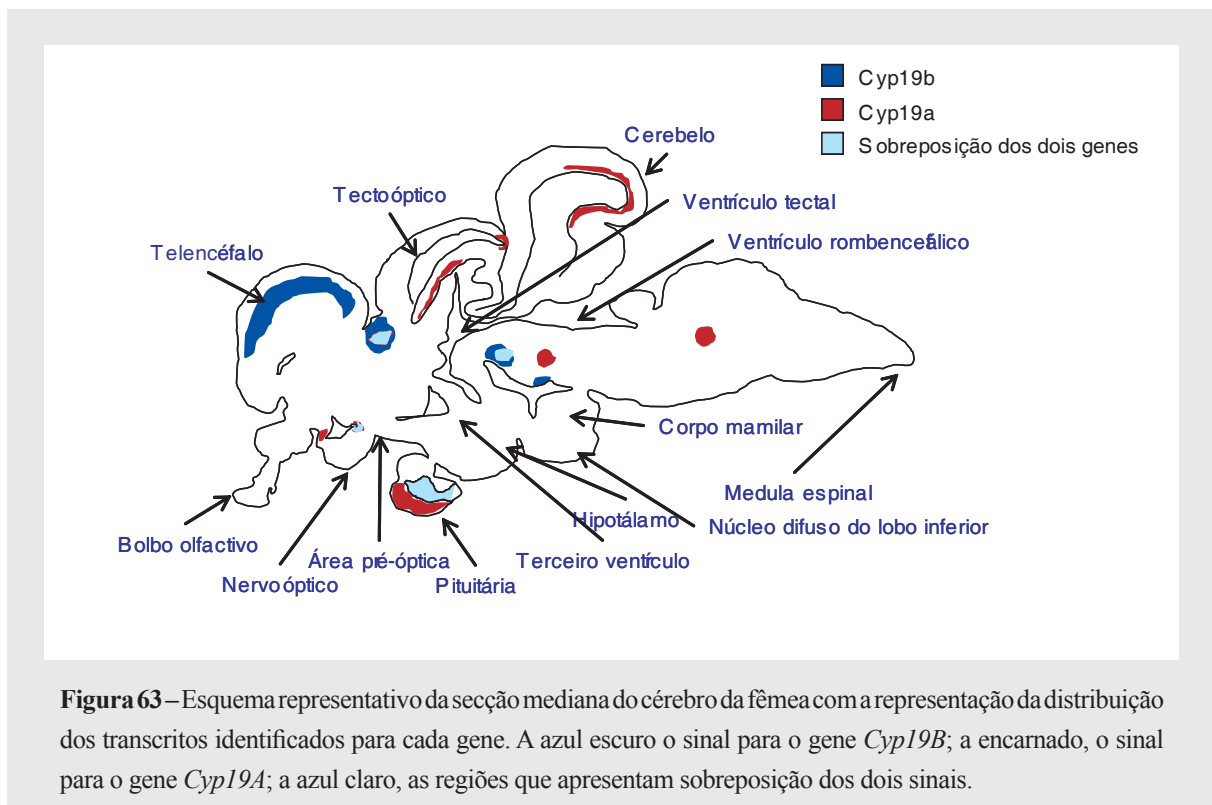
Os núcleos motores presentes na medula oblongata apresentam diferentes funções que podem estar relacionadas com a produção de movimentos natatórios, respiração e

movimentação da região opercular, e movimentação dos músculos da boca. Alguns dos núcleos que revelaram sinal foram já anteriormente relacionados com a produção de som nos peixes, como por exemplo o núcleo facial motor (NVII_m), e o núcleo sónico motor (SMN), sugerindo mais uma vez que os genes da aromatase podem ter um papel na produção de sons durante a reprodução em tilápia. A presença de maior expressão dos genes da aromatase no cérebro dos machos pode significar que a produção local de estrogénios influencia directamente a produção de sons que os machos emitem durante os rituais de acasalamento. Contrariamente, em *P. notatus*, uma espécie que apresenta estratégias alternativas de reprodução com a existência de machos satélite (machos tipo II), Schlinger e colaboradores (Schlinger *et al.*, 1999) identificaram níveis relativamente elevados de actividade da aromatase associada aos núcleos de produção de sons no rombencéfalo, com níveis mais significativos em fêmeas e em machos tipo II do que em machos parentais (machos tipo I). Por esta razão, estes autores especularam que este mecanismo pode estar presente para regular a diminuição da produção de sons nas fêmeas e nos machos tipo II.

A produção de sons associados à reprodução em ciclídeos ocorre fundamentalmente durante o início do ritual de acasalamento. Em *O. mossambicus*, estes comportamentos de produção de sons (Marshall, 1971; Marshall, 1972) acontecem durante todas as fases do processo, com particular incidência nas fases finais (Amorim *et al.*, 2003), o que realça a importância deste processo na reprodução desta espécie. A produção de estímulos sonoros relacionados com a reprodução está geralmente associada à movimentação dos músculos que controlam a bexiga gasosa (exemplo em Modesto & Canario, 2003), no entanto, em tilápia estes músculos não se encontram particularmente desenvolvidos, e a produção de sons parece depender dos dentes faríngeos (Lanzing, 1974). Em qualquer uma das situações a produção dos sons deverá ser controlada por núcleos nervosos localizados na medula oblongata e que neste trabalho revelaram expressar aromatase, quer sejam eles o núcleo facial motor, quer um núcleo sónico motor já identificado noutras espécies.

As estruturas produtoras de sons nos peixes são reguladas pelas hormonas esteróides, essencialmente pelos androgénios. Por exemplo a administração de testosterona aumenta a

massa do músculo sónico em *Cynoscion regalis* apenas nos machos (Connaughton & Taylor, 1995), revelando um dimorfismo sexual neste processo. Como referido por Ramage-Healey (2004), a acção das hormonas esteróides aumenta a actividade vocal motora de *Opsanus beta*. Neste caso, parece haver uma relação entre o rápido incremento da 11K-testosterona (um androgénio não aromatizável) e a actividade vocal desta espécie em situações de desafio pontuais como confrontos agonísticos ou sexuais (Ramage-Healey & Bass, 2005). Ramage-Healey & Bass (Ramage-Healey & Bass, 2005) postulam ainda que outros tipos de hormonas, como por exemplo os estrogénios, podem estar na base da mediação da produção destes chamamentos sonoros em situações que não de desafio. A presença de aromatase no núcleo sónico motor em tilápia, aqui identificada, poderá servir esta função convertendo os androgénios aromatizáveis circulantes em estrogénios e, desta forma, mediando a produção dos comportamentos sonoros utilizados nos rituais de acasalamento desta espécie. Também nas aves, as hormonas esteróides (estrogénios e androgénios) influenciam a estrutura sexualmente dimórfica de produção de sons (*Syrinx*) (Veney & Wade, 2005), o que indica claramente que o controlo da produção de sons é estabelecido pelos esteróides sexuais, fundamentalmente pelos androgénios pelo menos nos núcleos produtores de sons. Por outro lado, os resultados aqui apresentados sobre a expressão da aromatase em centros nervosos que controlam a movimentação dos músculos da face e que poderão ser contíguos aos núcleos sónico motores, parecem indicar que a conversão central de androgénios em estrogénios pode estar implicada no processo de activação deste comportamento sexual, uma vez que ele acontece apenas nos machos. Em diferentes espécies de peixes, independentemente da zona que detém a capacidade sonora, os núcleos nervosos de controlo destas estruturas situam-se na medula oblongata, onde nós identificámos transcritos de ambos os genes, mais propriamente em torno do fascículo longitudinal mediano (MLF) e do fascículo ventral (Fv) (revisão em Ladich & Bass, 1998).



Por outro lado, o telencéfalo estabelece ainda ligações com a habénula, um outro núcleo diencefálico que se localiza dorsalmente em relação ao núcleo talâmico anterior, ao tálamo dorsal e ao tálamo ventral e que revelou um sinal altamente específico para ambos os genes apenas na fêmea. Este complexo parece centralizar diferentes funções, entre as quais a mediação de comportamentos de reprodução (Wagner *et al.*, 1998). Essencialmente, nas fêmeas de mamíferos, a habénula desempenha um papel importante em comportamentos activados hormonalmente e que são cruciais para a reprodução, como a lordose (Etgen & Barfield, 1986) e os comportamentos de cuidados parentais. Os resultados aqui apresentados demonstram a presença de ambos os genes apenas na região habenular da fêmea (Figura 49 – A e Figura 55 – D, respectivamente para os genes *Cyp19B* e *Cyp19A*). Além do telencéfalo, esta região estabelece ligações com a área pré-óptica do hipotálamo (Tomizawa *et al.*, 2001; Giuliani *et al.*, 2002) fazendo parte de um complexo que controla as actividades comportamentais reprodutoras. A produção local de estrogénios neste núcleo pode estar implicada na regulação dos comportamentos de incubação por parte da fêmea, que necessita de produzir movimentos mastigatórios para manter uma boa qualidade de oxigenação da descendência incubada na boca. A noção de

que a produção de estrogénios no complexo habénular deverá ser importante é reforçada pela identificação de receptores de estrogénios nestes núcleos para ratos (Shughrue *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1998).

A última região do cérebro que revelou a presença significativa dos transcritos foi a área pré-óptica, onde a fêmea revelou um sinal claro para ambos os genes e em que no macho pode também ser detectado um sinal em torno do ventrículo diencefálico embora apenas para o *Cyp19B*. Esta diferença está seguramente relacionada com a distorção do cérebro do macho sem a qual seria esperado que o núcleo pré-óptico fosse mais expressivo no cérebro masculino do que no feminino. Esta região tem sido implicada na regulação dos comportamentos sexuais por expressar aromatase em diferentes vertebrados (exemplos em Balthazart & Surlémond, 1990; Balthazart *et al.*, 1990b). A melhor qualidade histológica do cérebro da fêmea permite observar de forma clara, a área pré-óptica e o nervo óptico. Esta região é descrita como sendo sexualmente dimórfica, além de que nos peixes, este núcleo expressa níveis de actividade para a aromatase entre 100 e 1000 vezes superior à descrita para os mamíferos (Callard *et al.*, 1990). No entanto, por ser difícil a localização desta estrutura no cérebro do macho, não foi possível detectar quaisquer transcritos associados a este núcleo, com excepção de um sinal pontual junto ao recesso do ventrículo diencefálico. Por outro lado, no cérebro da fêmea ambos os genes são expressos de forma muito clara e localizada num pequeno núcleo de células na porção mais rostral da área pré-óptica (Figura 49 e Figura 55), perto do nervo óptico. A detecção de aromatase na área pré-óptica foi já feita para outros vertebrados, quer no que se refere à detecção de células imunorreactivas e actividade da aromatase (Balthazart & Foidart, 1993; Roselli *et al.*, 1997; Roselli *et al.*, 1998b; Absil *et al.*, 2001b; Saldanha & Coomaralingam, 2005), quer no que se refere à presença de mRNA (Abdelgadir *et al.*, 1994; Aste *et al.*, 1998; Roselli *et al.*, 1998a).

Estudos feitos em truta arco-íris revelaram a presença de transcritos da aromatase para o gene *Cyp19B* em diferentes regiões do cérebro, algumas delas coincidentes com os resultados aqui apresentados como a área dorsal telencefálica e a área pré-óptica do hipotálamo (Menuet *et al.*, 2003). Estes autores referem ainda a presença de transcritos do

mesmo gene na pituitária, com uma grande incidência na *pars intermédia* e na *pars distalis proximal*, enquanto Callard e colaboradores (1988) referem para a tilápia moçambicana que a *pars distalis proximal* é região da pituitária que concentra maior actividade para a aromatase. Neste trabalho pudemos verificar que na tilápia a pituitária foi a região que revelou a maior intensidade de sinal específico não só para o gene *Cyp19B* como também para o *Cyp19A*, embora este último com uma expressão mais fraca. A comparação da distribuição dos sinais das hibridações *in situ* dos dois genes com os resultados da imunocitoquímica efectuada com anticorpos para a somatolactina, para a prolactina e para a hormona do crescimento (Figura 56) permitiram estabelecer a localização das células que estão a expressar aromatase. A distribuição dos sinais foi sensivelmente parecida entre os dois sexos, não sendo claro um dimorfismo sexual associado a esta enzima. Os genes parecem localizar-se de forma complementar, com o *Cyp19B* a ocupar uma posição ventral em relação à neuro-hipófise e o *Cyp19A* expressando-se numa posição mais ventral em relação ao *Cyp19B* e ao longo dos núcleos celulares que expressaram somatolactina e hormona do crescimento. Pode ainda ser observada uma ligeira sobreposição do gene *Cyp19A* com o *Cyp19B* perto da neuro-hipófise, mas apenas no cérebro da fêmea, embora este sinal revele uma intensidade muito fraca.

A localização de elevados níveis de actividade da aromatase na pituitária tem vindo a ser referida desde meados dos anos 80 (Pasmanik & Callard, 1985). A presença de mRNA do gene *Cyp19B* na pituitária foi detectada no peixe vermelho (Gelinis *et al.*, 1998; Tchoudakova & Callard, 1998) e mais recentemente no peixe zebra (Goto-Kazeto *et al.*, 2004) por hibridação *in situ*. A expressão da aromatase do cérebro está bem caracterizada em mamíferos por estar envolvida no controlo das funções reprodutivas (Lephart, 1996). Já em peixes, estas funções não estão ainda bem determinadas. Mais ainda, se por um lado é sabido que os estrogénios circulantes desempenham um importante papel no mecanismo de retroacção às gonadotrofinas (Saligaut *et al.*, 1998), não são ainda conhecidas outras funções fisiológicas dos estrogénios na pituitária.

Embora a presença da aromatase no cérebro dos teleósteos se encontre essencialmente associada às células da glia, como descrito para *Porichthys notatus* (Forlano *et al.*, 2001), e

para a truta, *O. mykiss* (Menuet *et al.*, 2003), neste trabalho não foi possível determinar qual a natureza das células em que foram detectados os sinais específicos. No entanto, pelo tipo de estruturas celulares presentes, pelo menos alguns dos transcritos parecem localizar-se em neurónios e não nas estruturas de suporte, como é o caso dos diferentes núcleos motores em que foram identificados, bem como as células de *Purkinje*, neurónios extremamente ramificados e que se localizam no cerebelo. Nestas últimas pode ser detectado um sinal para ambos os genes no cérebro da fêmea. A expressão da aromatase nas células de *Purkinje* no cérebro de e recém nascidos, e a conseqüente produção de estradiol promove o crescimento das dendrites das próprias células (Sakamoto *et al.*, 2003) tendo também sido identificado nesta região mRNA de ambos os receptores de estrogénios (E α e ER β) (Shughrue *et al.*, 1997), o que reforça o papel importante que a aromatização apresenta nesta estrutura. No cerebelo das aves (*Taeniopygia guttata*) as mesmas células foram também identificadas como imunorreactivas à aromatase (Saldanha *et al.*, 2000).

De forma resumida, a distribuição complementar de ambos os genes que codificam para a aromatase e a sua expressão em núcleos que de alguma forma estão ligados ao comportamento reforçam, também nos peixes, a importância da conversão de androgénios em estrogénios para a activação dos comportamentos sexuais. A expressão muito forte e complementar dos dois genes na pituitária, detectada no presente estudo, põe em evidência a importância desta enzima na mediação da actuação das gonadotrofinas. Embora não evidente para os sinais encontrados na pituitária, a distribuição dos transcritos revelou um dimorfismo sexual que parece acompanhar as necessidades comportamentais de cada um dos sexos: no macho a distribuição no telencéfalo, na região periventricular ao ventrículo diencefálico, mas sobretudo ao longo da medula oblongata, associado a núcleos motores que de alguma forma regulam quer movimentos natatórios, quer movimentos dos músculos da face e que por isso poderão estar envolvidos nos mecanismos de produção de sons pelos machos, sons estes que fazem parte dos rituais de acasalamento; na fêmea os clássicos sinais na área pré-óptica, embora estes tenham sido sobretudo referidos nos machos, mas também sinais no cerebelo, nas células de *Purkinje*, e sobretudo na habénula pode significar a sua influência no comportamento maternal que implica a incubação da postura.

Embora falte ainda informação sobre as funções da aromatase no controlo pelo sistema nervoso central do comportamento reprodutor, a distribuição do gene *Cyp19B* em áreas semelhantes ao que acontece para os mamíferos, associada ao facto de se verificar ainda a existência de transcritos para o gene *Cyp19A* em áreas próximas ou complementares, leva a crer que a aromatase deva desempenhar um papel importante no controlo das funções reprodutoras na tilápia e que os mecanismos básicos de regulação destes comportamentos foram conservados durante a evoluções dos vertebrados.

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO GERAL

A tilápia moçambicana é um ciclídeo africano que apresenta uma enorme plasticidade no que se refere à sua actuação face a diferentes factores ambientais. Apresenta características de um verdadeiro euritérmico, suportando variações de temperatura de grande amplitude e também características de uma espécie eurialina. Esta última característica tornou possível que esta espécie, originariamente de cursos de água doce, fosse bem sucedida na colonização de quase todos os ambientes aquáticos, a par de uma ampla distribuição geográfica. A par destas características, a tilápia moçambicana apresenta uma enorme eficiência reprodutora, reproduzindo-se continuamente sempre que as condições de temperatura e de fotoperíodo o permitem, o que acontece a latitudes tropicais.

Para espécies próximas (Coward & Bromage, 1999; Coward & Bromage, 2000; Campos-Mendoza et al., 2004), e mesmo para *O. mossambicus* (Smith & Haley, 1988), têm sido propostas diferentes dimensões de ciclos sexuais sobretudo nas fêmeas, embora a dimensão dos ciclos possa variar com as condições de cultura (revisão em Coward & Bromage, 2000). Neste trabalho, e para as nossas condições experimentais (fotoperíodo natural e $27\pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura), o ciclo sexual, definido entre a emissão de duas posturas consecutivas após interrupção do ciclo por remoção da postura, apresenta uma classe modal centrada nos 17 dias, embora tenha sido observada uma grande dispersão dos valores em torno deste ponto. A dimensão do ciclo já definida por outros autores aumenta substancialmente acaso ocorra incubação da descendência por parte da progenitora e a consequente protecção aos alevins, podendo nestes casos o ciclo estender-se até perto dos 40 dias (Smith & Haley, 1988).

Para a determinação da duração dos ciclos, optou-se por estabelecer núcleos familiares compostos por um macho e conjuntos de 4 fêmeas. Esta estrutura permitiu observar de forma sistemática que nestes grupos apenas algumas fêmeas revelaram capacidade de emitir posturas. Mais ainda, das fêmeas que entraram em ovulação, geralmente em cada tanque apenas uma delas o fazia de forma regular. Em algumas situações foi ainda verificado que uma segunda fêmea conseguia irregularmente produzir posturas, não resultando muitas vezes estas em descendências viáveis (dados não apresentados). Este facto leva-nos a especular que provavelmente existe um mecanismo comportamental que permite a

algumas fêmeas tornarem-se dominantes em relação às restantes, o que pode ser devido a uma hierarquia de dominância previamente estabelecida entre elas, ou a uma eventual escolha por parte do macho parental. No caso desta disparidade na emissão das posturas ser devida a uma questão social hierárquica e não à selecção por parte do macho de apenas algumas fêmeas, permanece em aberto qual será o factor que determinará esta hierarquia. Do nosso ponto de vista parece-nos provável que um de dois mecanismos deva estar na origem desta questão: por um lado, a dimensão da fêmea, que a poderá tornar dominante do ponto de vista corporal, sendo este o factor que lhe permite mais facilmente o acesso ao ninho construído pelo macho, inibindo comportamental e/ou quimicamente a emissão das posturas das demais conspécificas; por outro lado, a idade da fêmea, o que a verificar-se deverá funcionar inversamente ao descrito anteriormente, uma vez que fêmeas mais jovens e portanto de menores dimensões, apresentam uma eficiência reprodutiva mais elevada, quer na viabilidade, quer na dimensão das posturas emitidas (dados não apresentados).

No seguimento desta disparidade na emissão das posturas, foram ainda verificados diferentes perfis hormonais. As hormonas que foram seguidas ao longo do ciclo sexual da tilápia moçambicana foram o E_2 e a $17,20\beta\text{-P}$. No primeiro caso, e sempre que foram verificados ciclos regulares (entre 14 e 34 dias IEP) o estradiol apresentou um pico situado sensivelmente a meio do ciclo, como já verificado para outras espécies de peixes (exemplos em Kobayashi et al., 1988; Barnett & Pankhurst, 1994; Modesto & Canario, 2003b) e que é responsável pelo incremento da vitelogénese activa. O acompanhamento da $17,20\beta\text{-P}$, um dos universalmente aceites MIS, demonstrou que apenas se conseguem detectar valores relativamente elevados desta hormona junto à fase final do seu ciclo sexual, perto da emissão da postura. A hipótese de partida era que durante o curto período de maturação final dos ovócitos, menor taxa de metabolização e aumento da secreção originasse níveis elevados da hormona no sangue. Estes valores são, contudo, bastante fracos, não excedendo as 10ng/ml. Considera-se, no entanto, que esta observação pode ter duas possíveis origens, sendo que uma se prende com causas naturais e que poderá ser explicada pela assincronia de emissão das posturas nesta espécie. A tilápia moçambicana apresenta um desenvolvimento assíncrono do ovário, o que faz com que

apenas os folículos ováricos que se preparam para emitir os seus ovócitos devam estar a produzir activamente este progestogénios. No caso de ser este o esteróide responsável pela maturação final dos ovócitos nesta espécie, este facto poderá explicar a dificuldade de detecção desta hormona. Não foi, no entanto, possível estabelecer inequivocamente uma relação entre a maturação final dos ovócitos e a 17,20 β -P. As fracas concentrações de 17,20 β -P poderão ainda ser explicadas por um artefacto experimental, relacionado com o facto das amostragens terem sido sistematicamente efectuadas no período da manhã. Permanece assim, por esclarecer se este será ou não o esteróide indutor da maturação final na tilápia moçambicana, ou se os níveis que aqui foram detectados terão uma outra função no contexto social e reprodutivo da espécie.

Foi ainda interessante verificar que nos casos em que o IEP foi mais elevado, e por isso fora do que considerámos ser um padrão de emissão regular, os perfis destas duas hormonas foram diametralmente alterados, deixando de se verificar um pico claro a meio do ciclo para o estradiol e o pico final para a 17,20 β -P. Esta observação pode explicar a fraca eficiência reprodutiva de algumas fêmeas nos núcleos familiares e reforça a nossa convicção de que deverá existir um factor social, relacionado com o estatuto social de cada fêmea no grupo.

O estradiol, fundamental para o correcto desenvolvimento do ovário, apresenta uma enorme variedade de outras funções nos vertebrados (Nelson & Bulun, 2001; Parducz et al., 2006). A sua produção depende da conversão da testosterona pela acção enzimática da aromatase. Embora os ovários sejam a principal fonte de produção de estradiol, e uma das principais funções deste a estimulação hepática de vitelogenina, a circulação do estradiol, fornece ao cérebro informações fundamentais sobre a reprodução, num complexo sistema de controlo por mecanismos de retroacção. Todo o processo de regulação da enzima que produz esta hormona é relativamente complexo, como foi já retratado na introdução geral desta tese. Nos peixes, esta complexidade expressa-se pela existência de dois transcritos produzidos por dois genes distintos, que inicialmente se considerava ser uma particularidade dos ciprinídeos (Callard & Tchoudakova, 1997), mas que foi pela primeira vez por nós demonstrado não ser apenas uma característica desta família (Cruz

& Canario, 1999), podendo por isso ser estendida a outros teleósteos. Na tilápia nilótica foi já demonstrado que os dois genes *Cyp19* se encontram situados em cromossomas distintos e que nenhum dos dois se localiza nos cromossomas sexuais, pelo que estes genes não deverão ter um papel primordial na determinação sexual desta espécie (Harvey *et al.*, 2003). Por outro lado, a sua elevada expressão no cérebro dos peixes (ex: Chang *et al.*, 2005a; Greytak *et al.*, 2005) parece indicar que terão um papel importante na mediação da reprodução do grupo, sobretudo no que se refere a toda a componente comportamental. A existência de dois genes deverá ter tido origem num fenómeno de duplicação génica (Chiang *et al.*, 2001b), mas a existência de duas formas activas da mesma enzima acabou por servir funções e mecanismos de controlo específicos nos grupos em que aparecem, talvez associados a uma determinada função em tecidos específicos.

Embora classicamente os dois genes *Cyp19A* e *Cyp19B* sejam associados ao ovário e ao cérebro, os nossos resultados permitiram clarificar que a distribuição dos transcritos destes dois genes é bastante mais vasta do que nestes dois tecidos, não podendo inclusivamente ser estabelecida uma relação directa entre cada um dos genes e um conjunto particular de tecidos. É claro que o gene *Cyp19A* é fundamentalmente expresso no ovário e que o gene *Cyp19B* apresenta uma forte expressão no cérebro, rim, pituitária e também nas brânquias, o que não impede que exista alguma sobreposição da distribuição dos dois transcritos no mesmo tecido. Globalmente, há uma predominância da distribuição dos dois transcritos nos tecidos referidos, mas acompanhada de uma sobreposição que poderá afirmar um mecanismo redundante de actuação, o que reforça a importância da aromatase em diferentes funções fisiológicas.

Os resultados aqui apresentados por análise de RT-PCR quer a conjuntos de larvas quer a larvas individuais em diferentes estádios de desenvolvimento, permitiram concluir que os genes *Cyp19* são expressos muito cedo na organogénese, provavelmente com transmissão maternal de transcritos, revelando a importância da produção de estrogénios desde o início do desenvolvimento nesta espécie. Esta hipótese é suportada pela expressão de ER α desde o início do desenvolvimento embrionário, indicando que a actuação dos estrogénios deverá ser regulada através da expressão deste receptor. Embora a forma de aromatase que é detectada

mais cedo por RT-PCR seja a codificada pelo *Cyp19A*, o gene responsável pela produção da aromatase do cérebro (*Cyp19B*) é detectado com a mesma técnica a partir do dia 9 após a fertilização. No entanto, a análise de larvas individuais permitiu observar que ambas as formas são expressas a partir das primeiras horas do desenvolvimento (ver Figura 27). Em qualquer uma das situações, ambos os genes são expressos dentro do período sensível que determina a organização sexual do cérebro em tilápias, por acção das hormonas esteróides. Noutros vertebrados a diferenciação sexual é pelo menos em parte dependente da produção de estrogénios localmente no cérebro (revisão em Becker et al., 2002; Balthazart et al., 2003), sobretudo nos machos, o que poderá também estar a acontecer na tilápia moçambicana. Este argumento parece ser suportado pelos resultados por nós obtidos e descritos ao longo do capítulo 4, que indicam que ambas as formas da enzima podem ser claramente encontradas no cérebro quer de machos quer de fêmeas desta espécie, embora em localizações diferentes e eventualmente com funções distintas.

O estudo da distribuição da aromatase quer durante o desenvolvimento larvar, quer no sistema nervoso central em juvenis e adultos, reveste-se de particular interesse. Este interesse resulta do papel dos estrogénios na estruturação dos indivíduos, na diferenciação sexual e na organização sexualmente dimórfica do cérebro, o que culmina com o desempenho dos comportamentos sexuais. Quer ao longo do início do desenvolvimento embrionário, em que a aromatase é responsável pela organização do cérebro, quer na mediação da activação dos comportamentos sociais, esta enzima desempenha papéis chave, dos quais podem depender a capacidade de resposta a estímulos sexuais por parceiros conspecíficos, bem como o desempenho dos próprios comportamentos sexuais. No entanto, grande parte destes trabalhos foram feitos em aves e mamíferos (Bakker et al., 2003; Balthazart et al., 2003; Balthazart et al., 2004), e a documentação da estruturação do cérebro pelas hormonas esteróide nos peixes é escassa. Embora este trabalho não aborde as alterações fisiológicas emergentes da actividade da aromatase no desenvolvimento da tilápia, foi aqui possível visualizar as diferentes distribuições dos transcritos dos dois genes no cérebro dos dois sexos. Desta observação, foi ainda possível estabelecer uma relação entre a localização da aromatase em áreas específicas do cérebro desta espécie e

as diferentes funções comportamentais entre machos e fêmeas.

Com este trabalho tornou-se claro que a aromatase apresenta uma ampla distribuição no SNC dos dois sexos, embora com algumas diferenças na localização e intensidade dos transcritos. No cérebro, os dois genes distribuem-se de forma a produzir dois tractos: um que se divide entre o telencéfalo dorsal e que se projecta para o diencéfalo, mais especificamente para o hipotálamo; e um outro que se estende desde o tecto óptico e se projecta caudalmente ao longo da medula oblongata. Estas distribuições aparentam ser idênticas, embora mais localizadas, na fêmea.

Uma das estruturas importantes na mediação química da reprodução são os BO, em que a especificidade do sinal detectado não pôde ser confirmado. Esta questão deve, no entanto, ser clarificada, uma vez que existem relatos da presença de transcritos da aromatase nas regiões axoniais e nos botões sinápticos (Naftolin *et al.*, 1996; Balthazart *et al.*, 1991; Saldanha *et al.*, 2000).

A presença nos machos de *Cyp19* na área dorsal telencefálica, região que nas aves comporta os núcleos de controlo do canto, poderá significar que a presença deste gene nesta região pode ser importante na mediação da produção dos sons utilizados durante os rituais de acasalamento. Nos peixes, a produção de som tem sobretudo sido associada a núcleos motores presentes na medula oblongata, como são exemplos o núcleo facial motor (NVII_m), e o núcleo sónico motor (SMN), que controlam uma série de músculos responsáveis por estruturas produtoras de sons, como a bexiga gasosa ou a região opercular. Como na tilápia a produção de sons parece depender dos dentes faríngeos (Lanzing, 1974), os núcleos onde foram identificados sinais específicos para o gene *Cyp19* poderão ser responsáveis pela movimentação destas estruturas. Embora não o tenhamos conseguido identificar com clareza, é possível a existência de um trato neuronal que estabeleça a ligação entre o telencéfalo e a medula oblongata que expresse também o gene *Cyp19* e que em conjunto mediem a produção de sons, sob a influência da produção local de estrogénios, uma vez que na medula oblongata a sobreposição dos dois genes é bastante significativa nos dois sexos. Este facto reforça a ideia da importância da aromatase no processo.

No que diz respeito às fêmeas, puderam também ser identificados sinais específicos para os dois genes nos núcleos motores da medula oblongata, bem como em algumas regiões do diencéfalo e na área pré-óptica. Mais ainda, a habénula, apresentou também um sinal extremamente bem definido para os dois genes. As fêmeas de tilápia moçambicana, como outros ciclídeos, encubam a descendência com a boca, comportamento no qual as mesmas desenvolvem movimentos mandibulares para oxigenar a descendência. É possível que este comportamento seja mediado pela habénula, que noutros vertebrados é referida como um centro de controlo de comportamentos de cuidados parentais (Etgen & Barfield, 1986).

Desta forma, podemos dividir em duas as estruturas cerebrais que revelaram a presença da aromatase: um conjunto de núcleos motores que serão responsáveis pela movimentação quer de estruturas produtoras de sons, quer de estruturas responsáveis pela produção de diferentes movimentações musculares que mediem comportamentos sexuais; e por outro lado conjuntos de células que são classicamente apontadas como mediadoras de acções comportamentais directas. Assim, estruturas como o telencéfalo, o tecto óptico e a habénula, enviarão informação para os núcleos motores que serão responsáveis pela activação das movimentações e produção dos comportamentos específicos, quer estes sejam comportamentos de corte ou produção sonora nos machos ou ainda comportamentos de cuidados parentais nas fêmeas. Estas estruturas receberão ainda informação directa a partir do hipotálamo, em que o sinal foi mais claramente detectado nas fêmeas do que nos machos. A força do sinal detectado para ambos os genes na pituitária, pode ainda significar que o estradiol é importante na mediação da produção de outras hormonas com diferentes funções no organismo e/ou que exercerá mecanismos de retroacção sobre as gonadotrofinas de forma a regular a reprodução e os comportamentos reprodutores numa outra instância.

Em conclusão, é clara e inequívoca a presença de dois genes para a aromatase na tilápia moçambicana, genes estes que são expressos quer ao longo da ontogenia da espécie desde os primeiros estádios do desenvolvimento, e que nos adultos apresentam uma distribuição tecidular bastante vasta. Embora com diferentes distribuições no SNC de machos e fêmeas, os dois genes *Cyp19* puderam ser identificados em regiões específicas que foram anteriormente relacionadas com o desempenho de actividades comportamentais,

nomeadamente no desenvolvimento de comportamentos reprodutores. Os centros em que os transcritos da aromatase puderam ser identificados no cérebro foram apenas mapeados para indivíduos reprodutivamente activos, pelo que nos parece coerente especular que a presença destes transcritos em áreas com reconhecida importância nos comportamentos sexuais, deva estar relacionada com a mediação dos mesmos comportamentos. Assim, a confirmar-se, poderemos estender aos teleósteos o controlo hormonal da actividade comportamental para ambos os sexos, como foi já descrito para outros vertebrados. Parece-nos, no entanto, importante analisar no futuro qual a distribuição dos transcritos em indivíduos não reprodutores, em que os comportamentos de corte e de cuidados parentais não estejam presentes ou eminentes, para que a relação da presença dos genes com o comportamento possa ser estabelecida com maior segurança.

Este trabalho forneceu-nos um conjunto de ferramentas que permitem a futura investigação dos mecanismos moleculares associados aos processos em que os estrogénios estão envolvidos. Estas ferramentas estendem-se desde a compreensão da dimensão do ciclo sexual feminino e a variação das hormonas que o acompanham em peixes com ovulações regulares e irregulares, à distribuição dos diferentes genes ao longo do primeiro mês de vida e nos diferentes tecidos em adultos, bem como à distribuição específica destes transcritos no cérebro de ambos os sexos. Assim, estes resultados permitirão iniciar um conjunto diverso de estudos comportamentais que permitam compreender mais claramente a relação entre a aromatase e consequente produção de estrogénios no cérebro, e a activação dos comportamentos que medeiam a reprodução. Permitem ainda compreender de que forma a expressão, quer dos transcritos do gene quer das próprias proteínas por eles codificadas influenciam o estatuto social dos grupos estabelecidos.

Ficam assim abertas perspectivas experimentais bastante vastas que se estendem desde a compreensão do papel dos estrogénios quer na estruturação sexual do cérebro dos peixes, quer na activação dos comportamentos sexuais durante a fase adulta. Fica também em aberto a hipótese de estudo da actuação dos estrogénios como mediadores do comportamento e a possível investigação sobre a sua localização nos axónios e mesmo na transmissão sináptica como neurotransmissores, onde podem regular diferentes mecanismos.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFIA

- Abdelgadir, S. E., Resko, J. A., Ojeda, S. R., Lephart, E. D., McPhaul, M. J. & Roselli, C. E. 1994. Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in rat brain. *Endocrinology*, **135**, 395-401.
- Absil, P., Baillien, M., Ball, G. F., Panzica, G. C. & Balthazart, J. 2001a. The control of preoptic aromatase activity by afferent inputs in Japanese quail. *Brain Res Brain Res Rev*, **37**, 38-58.
- Absil, P., Riters, L. V. & Balthazart, J. 2001b. Preoptic aromatase cells project to the mesencephalic central gray in the male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Horm Behav*, **40**, 369-83.
- Agarwal, V. R., Ashanullah, C. I., Simpson, E. R. & Bulun, S. E. 1997. Alternatively spliced transcripts of the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in adipose tissue of women. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**, 70-4.
- Alexandre, C. & Balthazart, J. 1986. Effects of metabolism inhibitors, antiestrogens and antiandrogens on the androgen and estrogen induced sexual behavior in Japanese quail. *Physiol Behav*, **38**, 581-91.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389-402.
- Amores, A., Force, A., Yan, Y. L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R. K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y. L., Westerfield, M., Ekker, M. & Postlethwait, J. H. 1998. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science*, **282**, 1711-4.
- Amorim, M. C. P. & Almada, V. C. 2005. The outcome of male–male encounters affects subsequent sound production during courtship in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Animal Behaviour*, **69**, 595-601.
- Amorim, M. C. P., Fonseca, P. J. & Almada, V. C. 2003. Sound production during courtship and spawning of *Oreochromis mossambicus*: male-female and male-male interactions. *Journal of Fish Biology*, **62**, 658-672.

- Andrews, J. E., Smith, C. A. & Sinclair, A. H. 1997. Sites Of Estrogen Receptor and Aromatase Expression In the Chicken Embryo. *General & Comparative Endocrinology*, **108**, 182-190.
- Aquila, S., Sisci, D., Gentile, M., Middea, E., Siciliano, L. & Ando, S. 2002. Human ejaculated spermatozoa contain active P450 aromatase. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 3385-90.
- Arnold, A. P. 1996. Genetically Triggered Sexual Differentiation Of Brain and Behavior. *Hormones and Behavior*, **30**, 495-505.
- Arnold, A. P. 1997. Sexual differentiation of the zebra finch song system: positive evidence, negative evidence, null hypotheses, and a paradigm shift. *J Neurobiol*, **33**, 572-84.
- Aronson, L. R. 1949. An analysis of reproductive behaviour in mouth breeding fish, *Tilapia macrocephala* (Bleeker). *Zoologica*, **34**, 133-158.
- Aste, N., Panzica, G. C., Aimar, P., Viglietti-panzica, C., Foidart, A. & Balthazart, J. 1993. Implication of Testosterone Metabolism in the Control of the Sexually Dimorphic Nucleus of the Quail Preoptic Area. *Brain Research Bulletin*, **31**, 601-611.
- Aste, N., Panzica, G. C., Viglietti-Panzica, C., Harada, N. & Balthazart, J. 1998. Distribution and effects of testosterone on aromatase mRNA in the quail forebrain: a non-radioactive in situ hybridization study. *J Chem Neuroanat*, **14**, 103-15.
- Atteke, C., Vetillard, A., Fostier, A., Garnier, D. H., Jégo, P. & Bailhache, T. 2003. Effects of progesterone and estradiol on the reproductive axis in immature diploid and triploid rainbow trout. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, **134**, 693-705.
- Baillien, M. & Balthazart, J. 1997. A direct dopaminergic control of aromatase activity in the quail preoptic area. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **63**, 99-113.

- Bakker, J., Honda, S., Harada, N. & Balthazart, J. 2003. The aromatase knockout (ArKO) mouse provides new evidence that estrogens are required for the development of the female brain. *Ann N Y Acad Sci*, **1007**, 251-62.
- Ball, G. F. & Balthazart, J. 2004. Hormonal regulation of brain circuits mediating male sexual behavior in birds. *Physiol Behav*, **83**, 329-46.
- Balthazart, J. 1993. Brain aromatase and reproductive function. In: *Local Systems in Reproduction* (Ed. by Magness, R. R. & Naftolin, F.), pp. 13-31. New York: Raven Press.
- Balthazart, J. 1997. Steroid control and sexual differentiation of brain aromatase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **61**, 323-39.
- Balthazart, J., Baillien, M., Charlier, T. D., Cornil, C. A. & Ball, G. F. 2003. The neuroendocrinology of reproductive behavior in Japanese quail. *Domest Anim Endocrinol*, **25**, 69-82.
- Balthazart, J., Baillien, M., Cornil, C. A. & Ball, G. F. 2004. Preoptic aromatase modulates male sexual behavior: slow and fast mechanisms of action. *Physiol Behav*, **83**, 247-70.
- Balthazart, J. & Ball, G. F. 1998. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci*, **21**, 243-9.
- Balthazart, J. & Foidart, A. 1993. Brain aromatase and the control of male sexual behavior. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **44**, 521-40.
- Balthazart, J., Foidart, A., Absil, P. & Harada, N. 1996a. Effects of testosterone and its metabolites on aromatase-immunoreactive cells in the quail brain: relationship with the activation of male reproductive behavior. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **56**, 185-200.

- Balthazart, J., Foidart, A., Baillien, M., Harada, N. & Ball, G. F. 1998. Anatomical Relationships Between Aromatase and Tyrosine Hydroxylase in the Quail Brain - Double-Label Immunocytochemical Studies. *Journal of Comparative Neurology*, **391**, 214-226.
- Balthazart, J., Foidart, A. & Harada, N. 1990a. Immunocytochemical localization of aromatase in the brain. *Brain Res*, **514**, 327-33.
- Balthazart, J., Foidart, A. & Hendrick, J. C. 1990b. The induction by testosterone of aromatase activity in the preoptic area and activation of copulatory behavior. *Physiol Behav*, **47**, 83-94.
- Balthazart, J., Foidart, A., Surlemont, C. & Harada, N. 1991. Neuroanatomical specificity in the co-localization of aromatase and estrogen receptors. *J Neurobiol*, **22**, 143-57.
- Balthazart, J., Foidart, A., Surlemont, C., Harada, N. & Naftolin, F. 1992. Neuroanatomical specificity in the autoregulation of aromatase-immunoreactive neurons by androgens and estrogens: an immunocytochemical study. *Brain Research*, **574**, 280-290.
- Balthazart, J., Stoop, R., Foidart, A., Granneman, J. C. & Lambert, J. G. 1994a. Distribution and regulation of estrogen-2-hydroxylase in the quail brain. *Brain Res Bull*, **35**, 339-45.
- Balthazart, J., Stoop, R., Foidart, A. & Harada, N. 1994b. Synergistic control by androgens and estrogens of aromatase in the quail brain. *Neuroreport*, **5**, 1729-32.
- Balthazart, J. & Surlemont, C. 1990. Androgen and estrogen action in the preoptic area and activation of copulatory behavior in quail. *Physiol Behav*, **48**, 599-609.
- Balthazart, J., Tlemcani, O. & Ball, G. F. 1996b. Do sex differences in the brain explain sex differences in the hormonal induction of reproductive behavior? What 25 years of research on the Japanese quail tells us [Review]. *Hormones and Behavior*, **30**, 627-661.

- Balthazart, J., Tlemcani, O. & Harada, N. 1996c. Localization Of Testosterone-Sensitive and Sexually Dimorphic Aromatase-Immunoreactive Cells In the Quail Preoptic Area. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **11**, 147-171.
- Bardet, P. L., Horard, B., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V. & Vanacker, J. M. 2002. Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *J Mol Endocrinol*, **28**, 153-63.
- Barnett, C. W. & Pankhurst, N. W. 1994. Changes in plasma levels of gonadal steroids and gonad morphology during the spawning cycle of male and female demoiselles *Chromis dispilus* (Pisces: Pomacentridae). *Gen Comp Endocrinol*, **93**, 260-74.
- Baroiller, J. F., Chourrout, D., Fostier, A. & Jalabert, B. 1995. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *Journal of Experimental Zoology*, **273**, 216-223.
- Baroiller, J. F. & D'Cotta, H. 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **130**, 399-409.
- Baylis, J. 1974. The behavior and ecology of *Heterotilapia multispinosa* (Teleostei, Cichlidae). *Z. Tierpsychol*, **34**, 115-146.
- Becker, J. B., Breedlove, S. M., Crews, D. & McCarthy, M. M. 2002. *Behavioral Endocrinology*. Massachusetts: A Bradford Book - The MIT Press.
- Berg, H., Modig, C. & Olsson, P. E. 2004. 17beta-estradiol induced vitellogenesis is inhibited by cortisol at the post-transcriptional level in Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Reprod Biol Endocrinol*, **2**, 62.
- Berkovitz, G. D., Carter, K. M., Brown, T. R. & Migeon, C. J. 1990. Testosterone lowers aromatase activity in cultured human genital skin fibroblasts. *Mol Cell Endocrinol*, **69**, 187-97.

- Bernard, D. J., Bentley, G. E., Balthazart, J., Turek, F. W. & Ball, G. F. 1999. Androgen receptor, estrogen receptor alpha, and estrogen receptor beta show distinct patterns of expression in forebrain song control nuclei of European starlings. *Endocrinology*, **140**, 4633-4643.
- Beyer, C., Green, S. J. & Hutchison, J. B. 1994a. Androgens influence sexual differentiation of embryonic mouse hypothalamic aromatase neurons in vitro. *Endocrinology*, **135**, 1220-6.
- Beyer, C., Tramonte, R., Hutchison, R. E., Sharp, P. J., Barker, P. J., Huskisson, N. S. & Hutchison, J. B. 1994b. Aromatase-immunoreactive neurons in the adult female chicken brain detected using a specific antibody. *Brain Res Bull*, **33**, 583-8.
- Bilinska, B., Schmalz-Fraczek, B., Kotula, M. & Carreau, S. 2001. Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in the bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry. *Mol Cell Endocrinol*, **178**, 189-198.
- Bilinska, B., Schmalz-Fraczek, B., Sadowska, J. & Carreau, S. 2000. Localization of cytochrome P450 aromatase and estrogen receptors alpha and beta in testicular cells - an immunohistochemical study of the bank vole. *Acto Histochem.*, **102**, 167-181.
- Biswas, A. K., Morita, T., Yoshizaki, G., Maita, M. & Takeuchi, T. 2005. Control of reproduction in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) by photoperiod manipulation. *Aquaculture*, **243**, 229-239.
- Black, M. P., Moore, B., Canario, A. V. M., Ford, D., Reavis, R. H. & Grober, M. S. 2005. Reproduction in context: Field testing a laboratory model of socially controlled sex change in *Lythrypnus dalli* (Gilbert). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **318**, 127-143.
- Blomqvist, A. 2000. Sex hormones and pain: a new role for brain aromatase? *J Comp Neurol*, **423**, 549-51.

- Bluhdorn, D. R. & Arthington, A. H. 1990. Somatic characteristics of an Australian population of *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae). *Environmental Biology of Fish*, **29**, 277-291.
- Boerboom, D., Kerban, A. & Sirois, J. 1999. Dual regulation of promoter II- and promoter I f-derived cytochrome P450 aromatase transcripts in equine granulosa cells during human chorionic gonadotropin-induced ovulation: a novel model for the study of aromatase promoter switching. *Endocrinology*, **140**, 4133-41.
- Borg, B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **109C**, 219-245.
- Borg, B., Paulson, G. & Peute, J. 1986. Stimulatory effects of methyltestosterone on pituitary gonadotropic cells and testes leydig cells of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., in winter. *General and Comparative Endocrinology*, **62**, 54-61.
- Borges, R. A., Oliveira, R. F., Almada, V. C. & Canario, A. V. M. 1998. Short-term social modulation of 11-Ketotestosterone levels in males of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus* during male-female interactions. *Acta Ethologica*, **1**, 43-48.
- Bowman, C. J., Kroll, K. J., Hemmer, M. J., Folmar, L. C. & Denslow, N. D. 2000. Estrogen-induced vitellogenin mRNA and protein in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Gen Comp Endocrinol*, **120**, 300-13.
- Brandenberger, A. W., Tee, M. K., Lee, J. Y., Chao, V. & Jaffe, R. B. 1997. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER- beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**, 3509-12.
- Broadbent, J. & Read, E. M. 1999. Wholemout *in situ* hybridization of *Xenopus* and Zebrafish embryos. In: *Molecular methods in developmental biology* (Ed. by Guille, M.), pp. 57-67. New Jersey: Humana Press inc.
- Brown, A. E., Mani, S. & Tobet, S. A. 1999. The preoptic area anterior hypothalamus of different strains of mice: sex differences and development. *Brain Research. Developmental Brain Research*, **115**, 171-182.

- Bruton, M. N. & Boltz, R. E. 1975. Aspects of the biology of *Tilapia mossambica* Peters (Pisces: Cichlidae) in a natural freshwater lake (Lake Sibaya, South Africa). *J. Fish Biol.* **7**, 423-446.
- Bulun, S. E., Zeitoun, K. M., Takayama, K. & Sasano, H. 2000. Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. *J Mol Endocrinol.* **25**, 35-42.
- Burke, W. H. & Henry, M. H. 1999. Gonadal development and growth of chickens and turkeys hatched from eggs injected with an aromatase inhibitor. *Poult Sci.* **78**, 1019-33.
- Callard, G., Schlinger, B. & Pasmanik, M. 1990. Nonmammalian vertebrate models in studies of brain-steroid interactions. *J Exp Zool Suppl.* **4**, 6-16.
- Callard, G. V., Petro, Z. & Ryan, K. J. 1978. Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system. *Endocrinology.* **103**, 2283-90.
- Callard, G. V., Petro, Z. & Ryan, K. J. 1981. Biochemical evidence for aromatization of androgen to estrogen in the pituitary. *Gen Comp Endocrinol.* **44**, 359-64.
- Callard, G. V., Specker, J. L., Knapp, J., Nishioka, R. S. & Bern, H. A. 1988. Aromatase is concentrated in the proximal pars distalis of tilapia pituitary. *Gen Comp Endocrinol.* **71**, 70-9.
- Callard, G. V. & Tchoudakova, A. 1997. Evolutionary and functional significance of two CYP19 genes differentially expressed in brain and ovary of goldfish. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **61**, 387-92.
- Callard, G. V., Tchoudakova, A. V., Kishida, M. & Wood, E. 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **79**, 305-14.

- Campbell, C. M., Fostier, A., Jalabert, B. & Truscott, B. 1980. Identification and quantification of steroids in the serum of rainbow trout during spermiation and oocyte maturation. *J Endocrinol*, **85**, 371-8.
- Campos-Mendoza, A., McAndrew, B. J., Coward, K. & Bromage, N. 2004. Reproductive response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to photoperiodic manipulation; effects on spawning periodicity, fecundity and egg size. *Aquaculture*, **231**, 299-314.
- Canario, A. V. & Scott, A. P. 1988. Structure-activity relationships of C21 steroids in an in vitro oocyte maturation bioassay in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen Comp Endocrinol*, **71**, 338-48.
- Canario, A. V. & Scott, A. P. 1989a. Conjugates of ovarian steroids, including 17 alpha,20 beta-dihydroxy-4- pregnen-3-one (maturation-inducing steroid), accumulate in the urine of a marine teleost (plaice; *Pleuronectes platessa*). *J Endocrinol*, **123**, R1-4.
- Canario, A. V. & Scott, A. P. 1989b. Synthesis of 20 alpha-hydroxylated steroids by ovaries of the dab (*Limanda limanda*). *Gen Comp Endocrinol*, **76**, 147-58.
- Canario, A. V. & Scott, A. P. 1990a. Effects of steroids and human chorionic gonadotrophin on in vitro oocyte final maturation in two marine flatfish: the dab, *Limanda limanda*, and the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Gen Comp Endocrinol*, **77**, 161-76.
- Canario, A. V. & Scott, A. P. 1990b. Identification of, and development of radioimmunoassays for 17 alpha, 21-dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione and 3 alpha,17 alpha, 21-trihydroxy- 5 beta-pregnan-20-one in the ovaries of mature plaice (*Pleuronectes platessa*). *Gen Comp Endocrinol*, **78**, 273-85.
- Canario, A. V., Scott, A. P. & Flint, A. P. 1989. Radioimmunoassay investigations of 20 beta-hydroxylated steroids in maturing/ovulating female rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen Comp Endocrinol*, **74**, 77-84.

- Cardenas, H., Burke, K. A., Bigsby, R. M., Pope, W. F. & Nephew, K. P. 2001. Estrogen Receptor beta in the Sheep Ovary During the Estrous Cycle and Early Pregnancy. *Biol Reprod*, **65**, 128-34.
- Carlisle, S. L., Marxer-Miller, S. K., Canario, A. V. M., Oliveira, R. F., Carneiro, L. C. & Grober, M. S. 2000. Effects of 11-ketotestosterone on genital papilla morphology in the sex changing fish *Lythrypnus dalli*. *Journal of Fish Biology*, **57**, 445–456.
- Carneiro, L. C., Oliveira, R. F., Canario, A. V. M. & Grober, M. S. 2003. The effect of arginine vasotocin on courtship behaviour in a blenniid fish with alternative reproductive tactics. *Fish Physiology and Biochemistry*.
- Carpino, A., Pezzi, V., Rago, V., Bilinska, B. & Ando, S. 2001. Immunolocalization of cytochrome P450 aromatase in rat testis during postnatal development. *Tissue Cell*, **33**, 349-53.
- Carreau, S. 2000. Estrogens and male reproduction. *Folia Histochem Cytobiol*, **38**, 47-52.
- Carreau, S. 2001. Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. *Mol Cell Endocrinol*, **178**, 65-72.
- Carreau, S., Bourguiba, S., Lambard, S., Galeraud-Denis, I., Genissel, C., Bilinska, B., Benahmed, M. & Levallet, J. 2001. Aromatase expression in male germ cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **79**, 203-8.
- Carreau, S., Genissel, C., Bilinska, B. & Levallet, J. 1999. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int J Androl*, **22**, 211-23.
- Carreau, S. & Levallet, J. 2000. Testicular Estrogens and Male Reproduction. *News Physiol Sci*, **15**, 195-198.
- Chabab, A., Sultan, C., Fenart, O. & Descomps, B. 1986. Stimulation of aromatase activity by dihydrotestosterone in human skin fibroblasts. *J Steroid Biochem*, **25**, 165-9.

- Chakraborty, C., Dey, S. K. & Davis, D. L. 1989. Pattern and tissue distribution of catechol estrogen forming activity by pig conceptuses during the peri-implantation period. *J Anim Sci*, **67**, 991-8.
- Chang, X., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Kobayashi-Kajura, H., Sudhakumari, C. C. & Nagahama, Y. 2005a. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen Comp Endocrinol*, **141**, 101-15.
- Chang, X., Kobayashi, T., Todo, T., Ikeuchi, T., Yoshiura, Y., Kajiura-Kobayashi, H., Morrey, C. & Nagahama, Y. 1999. Molecular cloning of estrogen receptors alfa and beta in the ovary of a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Zoological Sciences*, **16**, 653-658.
- Chang, X. T., Kobayashi, T., Kajiura, H., Nakamura, M. & Nagahama, Y. 1997. Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis. *J Mol Endocrinol*, **18**, 57-66.
- Chang, X. T., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Kobayashi-Kajura, H., Sudhakumari, C. C. & Nagahama, Y. 2005b. Two types of distribution aromatase with different encoding genes, tissue and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology*, **141**, 101-115.
- Chardard, D., Desvages, G., Pieau, C. & Dournon, C. 1995. Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *Gen Comp Endocrinol*, **99**, 100-7.
- Chardard, D. & Dournon, C. 1999. Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltl*. *J Exp Zool*, **283**, 43-50.

- Chardard, D., Kuntz, S., Chesnel, A. & Flament, S. 2003. Effects of androgens on sex differentiation of the urodele *Pleurodeles waltl*. *J Exp Zool Part A Comp Exp Biol*, **296**, 46-55.
- Chiang, E. F., Yan, Y. L., Guiguen, Y., Postlethwait, J. & Chung, B. 2001a. Two Cyp19 (P450 Aromatase) Genes on Duplicated Zebrafish Chromosomes Are Expressed in Ovary or Brain. *Molecular Biology and Evolution*, **18**, 542-550.
- Chiang, E. F., Yan, Y. L., Tong, S. K., Hsiao, P. H., Guiguen, Y., Postlethwait, J. & Chung, B. C. 2001b. Characterization of duplicated zebrafish cyp19 genes. *J Exp Zool*, **290**, 709-14.
- Choi, I. H., Simmen, R. C. & Simmen, F. A. 1996. Molecular cloning of cytochrome P450 aromatase complementary deoxyribonucleic acid from periimplantation porcine and equine blastocysts identifies multiple novel 5'-untranslated exons expressed in embryos, endometrium, and placenta. *Endocrinology*, **137**, 1457-1467.
- Choi, J. Y., Park, J. G., Jeong, H. B., Lee, Y. D., Takemura, A. & Kim, S. J. 2005. Molecular cloning of cytochrome P450 aromatases in the protogynous wrasse, *Halichoeres tenuispinis*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, **141**, 49-59.
- Clark, R. W., Henderson-Arzapalo, A. & Sullivan, C. V. 2005. Disparate effects of constant and annually-cycling daylength and water temperature on reproductive maturation of striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture*, **249**, 497-513.
- Clemens, H. P. & Inslee, T. 1968. The production of unisexual broods of *Tilapia mossambica* sex-reversed with methyltestosterone. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **97**, 18-21.
- Coeckelberghs, V. 1975. Territorial, spawning and parental behaviour of *Lamprologus brichardi* Poll 1974 (Pisces, Cichlidae). *Annl. Soc. Roy. Zool. Belg.*, **105**, 73-86.
- Condeca, J. B. & Canario, A. V. 1999. The effect of estrogen on the gonads and on In vitro conversion of androstenedione to testosterone, 11-ketotestosterone, and estradiol-17 β in *Sparus aurata* (Teleostei, Sparidae) [In Process Citation]. *Gen Comp Endocrinol*, **116**, 59-72.

- Connaughton, M. A. & Taylor, M. H. 1995. Effects of exogenous testosterone on sonic muscle mass in the weakfish, *Cynoscion regalis*. *General and Comparative Endocrinology*, **100**, 238-245.
- Cooper, T. T., Clancy, A. N., Karom, M., Moore, T. O. & Albers, H. E. 2000. Conversion of testosterone to estradiol may not be necessary for the expression of mating behavior in male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Horm Behav*, **37**, 237-45.
- Couse, J. F., Hewitt, S. C., Bunch, D. O., Sar, M., Walker, V. R., Davis, B. J. & Korach, K. S. 1999. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science*, **286**, 2328-2331.
- Couse, J. F. & Korach, K. S. 1999. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews*, **20**, 358-417.
- Couse, J. F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J. A. & Korach, K. S. 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*, **138**, 4613-21.
- Coward, K. & Bromage, N. R. 1999. Spawning periodicity, fecundity and egg size in laboratory-held stocks of a substrate-spawning tilapiine, *Tilapia zillii* (Gervais). *Aquaculture*, **171**, 251-267.
- Coward, K. & Bromage, N. R. 2000. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **10**, 1-25.
- Coward, K., Bromage, N. R. & Little, D. C. 1998. Inhibition of Spawning and Associated Suppression of Sex Steroid Levels During Confinement in the Substrate-Spawning *Tilapia zilli*. *Journal of Fish Biology*, **52**, 152-165.
- Crapon de Caprona, M. D. 1974. The Effect of Chemical Stimuli From Conspecifics on the Behaviour of *Haplochromis burtoni* (Cichlidae, Pisces). *Experientia*, **30**, 1394-1395.

- Crews, D. 1996. Temperature-dependent sex determination - the interplay of steroid hormones and temperature. *Zoological Science*, **13**, 1-13.
- Crews, D. & Bergeron, J. M. 1994. Role of reductase and aromatase in sex determination in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. *Journal of Endocrinology*, **143**, 279-289.
- Crim, L. W. & Evans, D. M. 1983. Influence of testosterone and/or luteinizing hormone releasing hormone analogue on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout. *Biol Reprod*, **29**, 137-42.
- Cruz, M. & Canario, A. V. M. 1999. cDNA Cloning and Expression of Brain and Ovary Aromatase in Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. In: *6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (Ed. by Norberg, B., Kjesbu, O. S., Taranger, G. L., Andersson, E. & Stefansson, S. O.), pp. 193. Bergen (Norway).
- D’Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M. & Baroiller, J. F. 2001a. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol Reprod Dev*, **59**, 265-76.
- D’Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M. & Baroiller, J. F. 2001b. Search for genes involved in the temperature-induced gonadal sex differentiation in the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J Exp Zool*, **290**, 574-85.
- Dalla Valle, L., Lunardi, L., Colombo, L. & Belvedere, P. 2002a. European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cytochrome P450_{arom}: cDNA cloning, expression and genomic organization. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **80**, 25-34.
- Dalla Valle, L., Ramina, A., Vianello, S., Belvedere, P. & Colombo, L. 2002b. Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *J Steroid Biochem Mol Biol*, **82**, 19-32.
- De Silva, S. S. 1986. Reproductive biology of *Oreochromis mossambicus* populations of man-made lekes in Sri Lanka: a comparative study. *Aquaculture and Fisheries Management*, **17**, 31-47.

- De Silva, S. S. & Chandrasoma, J. 1980. Reproductive biology of *Sarotherodon mossambicus*, an introduced species, in an ancient man-made lake in Sri-Lanka. *Env. Biol. Fish.*, **5**, 253-259.
- de Vlaming, V. 1983. Oocyte development patterns and hormonal involvements among teleosts. In: *Control processes in fish physiology* (Ed. by Rankin, J. C., Pitcher, T. J. & Duncan, R.), pp. 176-199. London & Camberra: Croom Helm.
- Degani, G., Mananos, E. L., Jackson, K., Abraham, M. & Zohar, Y. 1997. Changes in plasma and pituitary GtH-II levels *in vitro* and *in vivo* in female blue gourami during the end of vitellogenesis and final oocyte maturation. *Journal of Experimental Zoology*, **279**, 377-385.
- Dorrington, J. H., Bendell, J. J. & Lobb, D. K. 1987. Aromatase activity in granulosa cells: regulation by growth factors. *Steroids*, **50**, 411-421.
- Durst, F., Benvenist, I., Salaun, J. P. & Werck, D. 1993. Function and diversity of plant cytochrome P450. In: *Cytochrome P450 - Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology* (Ed. by Lechner, M. C.), pp. 23-30. Lisbon - Portugal: John Libbey Eurotext.
- Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjold, M. & Gustafsson, J. A. 1997. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**, 4258-65.
- Epler, P. & Bieniarz, K. 1978. In vitro ovulation of European eel (*Anguilla anguilla* L.) oocytes following in vivo stimulation of sexual maturation. *Ann. Biol. anim., Biochim., Biophys.*, **18**, 991-995.
- Etgen, A. M. & Barfield, R. J. 1986. Antagonism of female sexual behavior with intracerebral implants of antiprogestin RU 38486: correlation with binding to neural progestin receptors. *Endocrinology*, **119**, 1610-7.

- Evrard, H., Baillien, M., Foidart, A., Absil, P., Harada, N. & Balthazart, J. 2000. Localization and controls of aromatase in the quail spinal cord. *J Comp Neurol*, **423**, 552-64.
- Fernald, R. D. 1984. Vision and Behavior in an African Cichlid Fish. *American Scientist*, **72**, 58-65.
- Filby, A. L. & Tyler, C. R. 2005. Molecular characterization of estrogen receptors 1, 2a, and 2b and their tissue and ontogenic expression profiles in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Biology of Reproduction*, **73**, 648-662.
- Foidart, A. & Balthazart, J. 1995. Sexual differentiation of brain and behavior in quail and zebra finches: Studies with a new aromatase inhibitor, R76713. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **53**, 267-275.
- Foidart, A., Harada, N. & Balthazart, J. 1994. Effects of steroidal and non steroidal aromatase inhibitors on sexual behavior and aromatase-immunoreactive cells and fibers in the quail brain. *Brain Res*, **657**, 105-23.
- Foidart, A., Harada, N. & Balthazart, J. 1995a. Aromatase-immunoreactive cells are present in mouse brain areas that are known to express high levels of aromatase activity. *Cell Tissue Res*, **280**, 561-74.
- Foidart, A., Silverin, B., Baillien, M., Harada, N. & Balthazart, J. 1998. Neuroanatomical distribution and variations across the reproductive cycle of aromatase activity and aromatase-immunoreactive cells in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Horm Behav*, **33**, 180-96.
- Foidart, A., Tlemcani, O., Harada, N., Abe-Dohmae, S. & Balthazart, J. 1995b. Pre- and post-translational regulation of aromatase by steroidal and non-steroidal aromatase inhibitors. *Brain Res*, **701**, 267-78.
- Forlano, P. M. & Bass, A. H. 2005. Seasonal plasticity of brain aromatase mRNA expression in glia: Divergence across sex and vocal phenotypes. *J Neurobiol*.

- Forlano, P. M., Deitcher, D. L., Myers, D. A. & Bass, A. H. 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J Neurosci*, **21**, 8943-55.
- Frade, P., Hubbard, P. C., Barata, E. N. & Canario, A. V. M. 2002. Olfactory sensitivity of the Mozambique tillapia to conspecific odours. *Journal of Fish Biology*, **61**, 1239-1254.
- Francis, R. C., Soma, K. & Fernald, R. D. 1993. Social regulation of the brain-pituitary-gonadal axis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7794-8.
- Frantzen, M., Arnesen, A. M., Damsgard, B., Tveiten, H. & Johnsen, H. K. 2004. Effects of photoperiod on sex steroids and gonad maturation in Arctic charr. *Aquaculture*, **240**, 561-574.
- Fukada, S., Sakai, N., Adachi, S. & Nagahama, Y. 1994. Steroidogenesis in the ovarian follicle of medaka (*Oryzias latipes*, a daily spawner) during oocyte maturation. *Development Growth & Differentiation*, **36**, 81-88.
- Furbass, R., Kalbe, C. & Vanselow, J. 1997. Tissue-specific expression of the bovine aromatase-encoding gene uses multiple transcriptional start sites and alternative first exons. *Endocrinology*, **138**, 2813-9.
- Gelinas, D. & Callard, G. V. 1993. Immunocytochemical and biochemical evidence for aromatase in neurons of the retina, optic tectum and retinotectal pathways in goldfish. *J Neuroendocrinol*, **5**, 635-41.
- Gelinas, D. & Callard, G. V. 1997. Immunolocalization of aromatase- and androgen receptor-positive neurons In the goldfish brain. *General and Comparative Endocrinology*, **106**, 155-168.
- Gelinas, D., Pitoc, G. A. & Callard, G. V. 1998. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **138**, 81-93.

- Gen, K., Okuzawa, K., Kumakura, N., Yamaguchi, S. & Kagawa, H. 2001. Correlation between messenger RNA expression of cytochrome P450 aromatase and its enzyme activity during oocyte development in the red seabream (*Pagrus major*). *Biol Reprod*, **65**, 1186-94.
- Genissel, C. & Carreau, S. 2001. Regulation of the aromatase gene expression in mature rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, **178**, 141-6.
- Giaquinto, P. C. & Volpato, G. L. 1997. Chemical communication, aggression, and conspecific recognition in the fish Nile tilapia. *Physiol Behav*, **62**, 1333-8.
- Giuliani, A., Minelli, D., Quaglia, A. & Villani, L. 2002. Telencephalo-habenulo-interpeduncular connections in the brain of the shark *Chiloscyllium arabicum*. *Brain Research*, **926**, 186-190.
- Gong, A., Freking, F. W., Wingfield, J., Schlinger, B. A. & Arnold, A. P. 1999. Effects of embryonic treatment with fadrozole on phenotype of gonads, syrinx, and neural song system in zebra finches. *General & Comparative Endocrinology*, **115**, 346-353.
- Gonzalez, A. & Piferrer, F. 2003. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*, **132**, 223-230.
- González, A. & Piferrer, F. 2002. Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *J Exp Zool*, **293**, 500-10.
- Goto-Kazeto, R., Kight, K. E., Zohar, Y., Place, A. R. & Trant, J. M. 2004. Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish. *Gen Comp Endocrinol*, **139**, 72-84.

- Greytak, S. R., Champlin, D. & Callard, G. V. 2005. Isolation and characterization of two cytochrome P450 aromatase forms in killifish (*Fundulus heteroclitus*): differential expression in fish from polluted and unpolluted environments. *Aquat Toxicol*, **71**, 371-89.
- Guiguen, Y., Baroiller, J. F., Ricordel, M. J., Iseki, K., McMeel, O. M., Martin, S. A. M. & Fostier, A. 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular Reproduction & Development*, **54**, 154-162.
- Hallgren, S. L. E., Linderöth, M. & Olsen, K. H. 2006. Inhibition of cytochrome p450 brain aromatase reduces two male specific sexual behaviours in the male Endler guppy (*Poecilia reticulata*). *General and Comparative Endocrinology*, **147**, 323-328.
- Halm, S., Martinez-Rodriguez, G., Rodriguez, L., Prat, F., Mylonas, C. C., Carrillo, M. & Zanuy, S. 2004. Cloning, characterisation, and expression of three oestrogen receptors (ERalpha, ERbeta1 and ERbeta2) in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Molecular Cellular Endocrinology*, **223**, 63-75.
- Harada, N. 1992. A unique aromatase (P-450AROM) mRNA formed by alternative use of tissue-specific exons 1 in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **189**, 1001-7.
- Harada, N., Abedohmae, S., Loeffen, R., Foidart, A. & Balthazart, J. 1993. Synergism Between Androgens and Estrogens in the Induction of Aromatase and Its Messenger RNA in the Brain. *Brain Research*, **622**, 243-256.
- Harada, N. & Yamada, K. 1992. Ontogeny of aromatase messenger ribonucleic acid in mouse brain: fluorometrical quantitation by polymerase chain reaction. *Endocrinology*, **131**, 2306-12.
- Harada, N., Yamada, K., Saito, K., Kibe, N., Dohmae, S. & Takagi, Y. 1990. Structural characterization of the human estrogen synthetase (aromatase) gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **166**, 365-72.

- Harvey, S. C., Kwon, J. Y. & Penman, D. J. 2003. Physical mapping of the brain and ovarian aromatase genes in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, by fluorescence in situ hybridization. *Anim Genet*, **34**, 62-4.
- Hawkins, M. B., Thornton, J. W., Crews, D., Skipper, J. K., Dotte, A. & Thomas, P. 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10751-6.
- Heiligenberg, W. 1965. Colour Polymorphism in the Males of an African Cichlid Fish. *J. Zool.*, **146**, 95-97.
- Hert, E. 1989. The function of egg-spots in an African mouth-brooding cichlid fish. *Anim. Behav*, **37**, 726-732.
- Hess, R. A. 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **1**, 52.
- Hickey, G. J., Chen, S. A., Besman, M. J., Shively, J. E., Hall, P. F., Gaddy-Kurten, D. & Richards, J. S. 1988. Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology*, **122**, 1426-36.
- Hickey, G. J., Oonk, R. B., Hall, P. F. & Richards, J. S. 1989. Aromatase cytochrome P450 and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 in corpora lutea of pregnant rats: diverse regulation by peptide and steroid hormones. *Endocrinology*, **125**, 1673-82.
- Hines, G. A., Boots, L. R., Wibbels, T. & Watts, S. A. 1999. Steroid levels and steroid metabolism in relation to early gonadal development in the tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei : Cyprinoidei). *General & Comparative Endocrinology*, **114**, 235-248.
- Hinshelwood, M. M. & Mendelson, C. R. 2001. Tissue-specific expression of the human CYP19 (aromatase) gene in ovary and adipose tissue of transgenic mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **79**, 193-201.

- Hirschenhauser, K., Taborsky, M., Oliveira, T., Canario, A. & Oliveira, R. 2004. A test of the 'challenge hypothesis' in cichlid fish: simulated partner and territory intruder experiments. *Animal Behaviour*, **68**, 741-750.
- Howell, R. A., Berlinsky, D. L. & Bradley, T. M. 2003. The effects of photoperiod manipulation on the reproduction of black sea bass, *Centropristis striata*. *Aquaculture*, **218**, 651-669.
- Huang, Y. S., Schmitz, M., Le Belle, N., Chang, C. F., Querat, B. & Dufour, S. 1997. Androgens stimulate gonadotropin-II beta-subunit in eel pituitary cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol*, **131**, 157-66.
- Hulata, G., Rothbard, S. & Avtalion, R. R. 1981. Evidence for multiple paternity in *Sarotherodon* broods. *Aquaculture*, **25**, 281-283.
- Hunter, G. A. & Donaldson, E. M. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: *Reproduction: Behavior and Fertility Control* (Ed. by Hoar, W. S., Randall, D. J. & Donaldson, E. M.), pp. 223-303. New York.: Academic Press.
- Hutchison, J. B. 1997. Gender-specific steroid metabolism in neural differentiation. *Cell Mol Neurobiol*, **17**, 603-26.
- Hutchison, J. B., Beyer, C., Hutchison, R. E. & Wozniak, A. 1995. Sexual dimorphism in the developmental regulation of brain aromatase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **53**, 307-13.
- Ijiri, S., Kazeto, Y., Lokman, P. M., Adachi, S. & Yamauchi, K. 2003. Characterization of a cDNA encoding P-450 aromatase (CYP19) from Japanese eel ovary and its expression in ovarian follicles during induced ovarian development. *Gen Comp Endocrinol*, **130**, 193-203.
- Jacobs, E. C., Arnold, A. P. & Campagnoni, A. T. 1996. Zebra finch estrogen receptor cDNA: cloning and mRNA expression. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **59**, 135-45.

- Jaillon, O., Aury, J. M., Brunet, F., Petit, J. L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., Nicaud, S., Jaffe, D., Fisher, S., Lutfalla, G., Dossat, C., Segurens, B., Dasilva, C., Salanoubat, M., Levy, M., Boudet, N., Castellano, S., Anthouard, V., Jubin, C., Castelli, V., Katinka, M., Vacherie, B., Biemont, C., Skalli, Z., Cattolico, L., Poulain, J., De Berardinis, V., Cruaud, C., Duprat, S., Brottier, P., Coutanceau, J. P., Gouzy, J., Parra, G., Lardier, G., Chapple, C., McKernan, K. J., McEwan, P., Bosak, S., Kellis, M., Volff, J. N., Guigo, R., Zody, M. C., Mesirov, J., Lindblad-Toh, K., Birren, B., Nusbaum, C., Kahn, D., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V., Schachter, V., Quetier, F., Saurin, W., Scarpelli, C., Wincker, P., Lander, E. S., Weissenbach, J. & Roest Crolius, H. 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*, **431**, 946-57.
- Jakimiuk, A. J., Weitsman, S. R., Yen, H. W., Bogusiewicz, M. & Magoffin, D. A. 2002. Estrogen receptor alpha and beta expression in theca and granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 5532-8.
- Janulis, L., Bahr, J. M., Hess, R. A., Janssen, S., Osawa, Y. & Bunick, D. 1998. Rat Testicular Germ Cells and Epididymal Sperm Contain Active P450 Aromatase. *Journal of Andrology*, **19**, 65-71.
- Jeng, S. R., Dufour, S. & Chang, C. F. 2005. Differential expression of neural and gonadal aromatase enzymatic activities in relation to gonadal development in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Journal of Experimental Zoology Part a-Comparative Experimental Biology*, **303A**, 802-812.
- Jeyasuria, P. & Place, A. R. 1998. Embryonic brain-gonadal axis in temperature-dependent sex determination of reptiles: a role for P450 aromatase (CYP19). *J Exp Zool*, **281**, 428-49.
- Johnson, A. K., Thomas, P. & Wilson Jr, R. R. 1998. Seasonal Cycles of Gonadal Development and Plasma Sex Steroid Levels in *Epinephelus morio*, a Protogynous Grouper in the Eastern Gulf of Mexico. *Journal of Fish Biology*, **52**, 502-518.

- Jowett, T., Mancera, M., Amores, A. & Yan, Y.-L. 1996. *In situ* hybridization to embryos whole mount and tissue sections: mRNA detection and application to developmental biology. In: *In situ hybridization* (Ed. by Clark, M.). Weinheim: Chapman & Hall.
- Kah, O., Anglade, I., Leprêtre, E., Dubourg, P. & Demonbrison, D. 1993. The Reproductive Brain in Fish. *Fish Physiology and biochemistry*, **11**, 85-98.
- Kamat, A., Hinshelwood, M. M., Murry, B. A. & Mendelson, C. R. 2002. Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans. *Trends Endocrinol Metab*, **13**, 122-8.
- Kamat, A. & Mendelson, C. R. 2001. Identification of the regulatory regions of the human aromatase P450 (CYP19) gene involved in placenta-specific expression. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **79**, 173-80.
- Katz, Y. & Eckstein, B. 1974. Changes in steroid concentration in the blood of female *Tilapia aurea* (Teleostei, Cichlidae) during initiation of spawning. *Endocrinology*, **95**, 963-967.
- Keenleyside, M. H. A. 1985. Effects of Altered Adult Sex Ratio on the Behaviour of Breeding *Herotilapia multispinosa* (Teleostei, Cichlidae). *Netherlands Journal of Zoology*, **35**, 32-44.
- Keenleyside, M. H. A. & Mackereth, R. W. 1992. Effect of Loss of Male Parent on Brood Survival in a Biparental Cichlid Fish. *Environmental Biology of Fishes*, **34**, 207-212.
- Kime, D. E. 1993. 'Classical' and 'non-classical' reproductive steroids in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **3**, 160-180.
- King, W. t., Thomas, P., Harrell, R. M., Hodson, R. G. & Sullivan, C. V. 1994. Plasma levels of gonadal steroids during final oocyte maturation of striped bass, *Morone saxatilis* L. *Gen Comp Endocrinol*, **95**, 178-91.

- Kirilovas, D., Bergstrom, M., Bonasera, T. A., Bergstrom-Pettermann, E., Naessen, T., Holte, J., Carlstrom, K., Simberg, N. & Langstrom, B. 1999. In vitro evaluation of aromatase enzyme in granulosa cells using a [¹¹C]vorozole binding assay. *Steroids*, **64**, 266-72.
- Kishida, M. & Callard, G. V. 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology*, **142**, 740-50.
- Kishida, M. & Specker, J. L. 2000. Paternal mouthbrooding in the black-chinned tilapia, *Sarotherodon melanotheron* (Pisces : Cichlidae): Changes in gonadal steroids and potential for vitellogenin transfer to larvae. *Hormones & Behavior*, **37**, 40-48.
- Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y. & Abe, S. I. 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Mol Endocrinol*, **23**, 167-76.
- Klinge, C. M. 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*, **29**, 2905-2919.
- Kmicikiewicz, I. & Bilinska, B. 1997. The capability of androgen aromatization by bank vole Leydig cells in vitro: the effect of aromatase inhibitor. *J Physiol Pharmacol*, **48**, 861-71.
- Kmicikiewicz, I., Krezolek, A. & Bilinska, B. 1997. The effect of aromatase inhibitor on basal and testosterone- supplemented estradiol secretion by Leydig cells in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **105**, 113-8.
- Kobayashi, M., Aida, K. & Hanyu, I. 1987. Hormone changes during ovulation and effects of steroid hormones on plasma gonadotropin levels and ovulation in goldfish. *Gen Comp Endocrinol*, **67**, 24-32.
- Kobayashi, M., Aida, K. & Hanyu, I. 1988. Hormone changes during the ovulatory cycle in goldfish. *Gen Comp Endocrinol*, **69**, 301-307.

- Krege, J. H., Hodgin, J. B., Couse, J. F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J. F., Sar, M., Korach, K. S., Gustafsson, J. & Smithies, O. 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Medical sciences*, **95**, 15677-15682.
- Kuiper, G., Enmark, E., Peltouhikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J. A. 1996. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 5925-5930.
- Kuwamura, T. 1986. Parental care and mating systems of cichlid fishes in lake Tanganyika: a preliminary field survey. *J. Ethol*, **4**, 129-146.
- Kuwamura, T. 1987. Distribution of Fishes in Relation to the Depth and Substrate at Myako, East-Middle Coast of Lake Tanganyika. *African Study Monographs*, **7**, 1-14.
- Kuwamura, T., Nagoshi, M. & Sato, T. 1989. Female-to-male shift of mouthbrooding in a cichlid fish, *Tanganicodus irsacae*, with notes on breeding habits of two related species in Lake Tanganyika. *Environmental Biology of Fish*, **24**, 187-198.
- Kwon, J. Y., McAndrew, B. J. & Penman, D. J. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol Reprod Dev*, **59**, 359-70.
- Ladich, F. & Bass, A. H. 1998. Sonic/vocal motor pathways in catfishes: comparisons with other teleosts. *Brain Behav Evol*, **51**, 315-30.
- Lakaye, B., Foidart, A., Grisar, T. & Balthazart, J. 1998. Partial cloning and distribution of estrogen receptor beta in the avian brain. *Molecular Neuroscience*, **9**, 2743-2748.
- Lamba, V. J., Goswami, S. V. & Sundararaj, B. I. 1983. Circannual and circadian variations in plasma levels of steroids (cortisol, estradiol-17 beta, estrone, and testosterone) correlated with the annual gonadal cycle in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen Comp Endocrinol*, **50**, 205-25.

- Lance, V. A. 1997. Sex determination in reptiles: an update. *Amer. Zool.*, **37**, 504-513.
- Lance, V.A. & Bogart, M. H. 1992. Disruption of ovarian development in alligator embryos treated with an aromatase inhibitor. *General and Comparative Endocrinology*, **86**, 59-71.
- Lanoux, M. J., Cleland, W. H., Mendelson, C. R., Carr, B. R. & Simpson, E. R. 1985. Factors affecting the conversion of androstenedione to estrogens by human fetal hepatocytes in monolayer culture. *Endocrinology*, **117**, 361-8.
- Lanzing, W. J. R. 1974. Sound production in the cichlid *Tilapia mossambica* Peters. *J. Fish Biol*, **6**, 341-347.
- Lanzino, M., Catalano, S., Genissel, C., Ando, S., Carreau, S., Hamra, K. & McPhaul, M. J. 2001. Aromatase messenger RNA is derived from the proximal promoter of the aromatase gene in Leydig, Sertoli, and germ cells of the rat testis. *Biol Reprod*, **64**, 1439-43.
- Larsen, D. A. & Swanson, P. 1997. Effects of gonadectomy on plasma gonadotropins I and II in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, **108**, 152-60.
- Lauber, M. E. & Lichtensteiger, W. 1994. Pre- and postnatal ontogeny of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid expression in the male rat brain studied by in situ hybridization. *Endocrinology*, **135**, 1661-8.
- Lavery, R. J. & Reeb, S. G. 1994. Effect of mate removal on current and subsequent parental care in the convict cichlid (Pisces: Cichlidae). *Ethology*, **97**, 265-277.
- Lephart, E. D. 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Research Reviews*, **22**, 1-26.
- Leshin, M., Baron, J., George, F. W. & Wilson, J. D. 1981. Increased estrogen formation and aromatase activity in fibroblasts cultured from the skin of chickens with the Henny feathering trait. *J Biol Chem*, **256**, 4341-4.

- Leshin, M., Noble, J. F., George, F. W. & Wilson, J. D. 1983. Characterization of the increased estrogen synthesis in skin fibroblasts from the Sebright bantam. *J Steroid Biochem*, **18**, 33-9.
- Levallet, J., Bilinska, B., Mittre, H., Genissel, C., Fresnel, J. & Carreau, S. 1998a. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol Reprod*, **58**, 919-26.
- Levallet, J., Mittre, H., Delarue, B. & Carreau, S. 1998b. Alternative splicing events in the coding region of the cytochrome P450 aromatase gene in male rat germ cells. *J Mol Endocrinol*, **20**, 305-12.
- Levavi-Sivan, B., Biran, J. & Fierman, E. 2006. Sex Steroids Are Involved in the Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone and Dopamine D2 Receptors in Female Tilapia Pituitary. *Biol Reprod*.
- Levin, E. R. 1999. Cellular Functions of the Plasma Membrane Estrogen Receptor. *Trends Endocrinol Metab*, **10**, 374-377.
- Li, G. L., Liu, X. C. & Lin, H. R. 2006. Seasonal changes of serum sex steroids concentration and aromatase activity of gonad and brain in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Anim Reprod Sci*.
- Liley, N. R., Breton, B., Fostier, A. & Tan, E. S. 1986. Endocrine changes associated with spawning behavior and social stimuli in a wild population of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Males. *Gen Comp Endocrinol*, **62**, 145-56.
- Lindzey, J. & Korach, K. S. 1997. Developmental and physiological effects of estrogen receptor gene disruption in mice. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **8**, 137-144.
- Lobo, J. O. & Bellino, F. L. 1989. Oestrogen synthetase (aromatase) and hormone secretion in primary cultures of human placental trophoblast cells. Effects of cyclic AMP addition at the start of culture in attached and unattached cell populations. *Placenta*, **10**, 377-85.

- Lokman, P. M. & Young, G. 1995. In vitro biosynthesis of oestradiol-17 β and 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one by vitellogenic ovarian follicles from migrating New Zealand longfinned eels (*Anguilla dieffenbachii*). *Aquaculture*, **135**, 17-26.
- Longcope, C., Billiar, R. B., Takaoka, Y., Reddy, P. S., Richardson, D. & Little, B. 1983. Tissue sites of aromatization in the female rhesus monkey. *Endocrinology*, **113**, 1679-82.
- Lopez, E. & Fontaine, Y. A. 1990. Hormonal in vivo stimulation of the ovary in the yellow European eel. *Reproduction Nutrition Développement*, **30**, 577-582.
- Luconi, M., Forti, G. & Baldi, E. 2002. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **80**, 369-81.
- Ma, C. H., Dong, K. W. & Yu, K. L. 2000. cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor beta-subtype in goldfish (*Carassius auratus*) [In Process Citation]. *Biochim Biophys Acta*, **1490**, 145-52.
- Mackereth, R. W. & Keenleyside, M. H. A. 1993. Breeding Territoriality and Pair Formation in the Convict Cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*; Pisces, Cichlidae). *Can. J. Zool.*, **71**, 960-967.
- MacLusky, N. J., Clark, A. S., Naftolin, F. & Goldman-Rakic, P. S. 1987. Estrogen formation in the mammalian brain: possible role of aromatase in sexual differentiation of the hippocampus and neocortex. *Steroids*, **50**, 459-74.
- Magri, M. H., Solari, A., Billard, R. & Reinaud, P. 1985. Influence of testosterone on precocious sexual development in immature rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, **57**, 411-21.
- Mahendroo, M. S., Means, G. D., Mendelson, C. R. & Simpson, E. R. 1991. Tissue-specific expression of human P-450AROM. The promoter responsible for expression in adipose tissue is different from that utilized in placenta. *J Biol Chem*, **266**, 11276-81.

- Marshall, J. A. 1971. Sound production by *Tilapia mossambica* (Pisces: Cichliade). *Am. Zool*, **11**, 632.
- Marshall, J. A. 1972. Influence of male sound production on oviposition in females *Tilapia mossambica* (Pisces, Cichlidae). *Am. Zool.*, **12**, 663-664.
- Martins, R. P., Leach, R. E. & Krawetz, S. A. 2001. Whole-body gene expression by data mining. *Genomics*, **72**, 34-42.
- Matsuyama, M., Onozato, S. & Kashiwagi, M. 2002. Endocrine control of diurnal oocyte maturation in the kyusen wrasse, *Halichoeres poecilopterus*. *Zoolog Sci*, **19**, 1045-53.
- Matsuyama, M., Shiraishi, T., Sundaray, J. K., Rahman, A., Ohta, K. & Yamaguchi, A. 2005. Steroidogenesis in ovarian follicles of chub mackerel, *Scomber japonicus*. *Zoolog Sci*, **22**, 101-10.
- Menuet, A., Anglade, I., Le Guevel, R., Pellegrini, E., Pakdel, F. & Kah, O. 2003. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha. *J Comp Neurol*, **462**, 180-93.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M. M., Anglade, I., Pakdel, F. & Kah, O. 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J Comp Neurol*, **485**, 304-20.
- Meyer, A. & Scharl, M. 1999. Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (- to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Current Opinion in Cell Biology*, **11**, 699-704.
- Migaud, H., Fontaine, P., Kestemont, P., Wang, N. & Brun-Bellut, J. 2004. Influence of photoperiod on the onset of gonadogenesis in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquaculture*, **241**, 561-574.

- Milla, S., Jalabert, B., Rime, H., Prunet, P. & Bobe, J. 2006. Hydration of rainbow trout oocyte during meiotic maturation and in vitro regulation by 17,20{beta}-dihydroxy-4-pregnen-3-one and cortisol. *J Exp Biol*, **209**, 1147-56.
- Miranda, J. A., Oliveira, R. F., Carneiro, L. C., Santos, R. S. & Grober, M. S. 2003. Neurochemical correlates of male polymorphism and alternative reproductive tactics in the Azorean rock-pool blenny, *Parablennius parvicornis*. *General and Comparative Endocrinology*, **132**, 183-189.
- Miura, T., Higuchi, M., Ozaki, Y., Ohta, T. & Miura, C. 2006. Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7333-8.
- Modesto, T. & Canario, A. V. 2003a. Hormonal control of swimbladder sonic muscle dimorphism in the Lusitanian toadfish *Halobatrachus didactylus*. *J Exp Biol*, **206**, 3467-77.
- Modesto, T. & Canario, A. V. 2003b. Morphometric changes and sex steroid levels during the annual reproductive cycle of the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*. *Gen Comp Endocrinol*, **131**, 220-31.
- Mondschein, J. S., Hersey, R. M., Dey, S. K., Davis, D. L. & Weisz, J. 1985. Catechol estrogen formation by pig blastocysts during the preimplantation period: biochemical characterization of estrogen-2/4- hydroxylase and correlation with aromatase activity. *Endocrinology*, **117**, 2339-46.
- Montero, M., Le Belle, N., King, J. A., Millar, R. P. & Dufour, S. 1995. Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroendocrinology*, **61**, 525-35.
- Moore, A. & Scott, A. P. 1992. 17 alpha,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulphate is a potent odorant in precocious male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr which have been pre-exposed to the urine of ovulated females. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **249**, 205-9.

- Mosconi, G., Carnevali, O., Habibi, H. R., Sanyal, R. & Polzonetti-Magni, A. M. 2002. Hormonal mechanisms regulating hepatic vitellogenin synthesis in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**, C673-8.
- Mosselman, S., Polman, J. & Dijkema, R. 1996. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, **392**, 49-53.
- Mrowka, W. 1986. Satiation restores brood care motivation in the female mouthbrooder *Pseudocrenilabrus multicolor* (Cichlidae). *Physiology & Behaviour*, **38**, 153-156.
- Muehlenbein, M. P., Watts, D. P. & Whitten, P. L. 2004. Dominance rank and fecal testosterone levels in adult male Chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) at Ngogo, Kibale National Park, Uganda. *Am J Primatol*, **64**, 71-82.
- Munoz-Cueto, J. A., Burzawa-Gerard, E., Kah, O., Valotaire, Y. & Pakdel, F. 1999. Cloning and sequencing of the gilthead sea bream estrogen receptor cDNA. *DNA Seq*, **10**, 75-84.
- Murphy, C. A., Stacey, N. E. & Corkum, L. D. 2001. Putative steroidal pheromones in the round goby, *Neogobius melanostomus*: olfactory and behavioral responses. *J Chem Ecol*, **27**, 443-70.
- Mylonas, C. C., Woods, L. C., 3rd, Thomas, P. & Zohar, Y. 1998. Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) in captivity, during postvitellogenesis and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRH α -delivery systems [In Process Citation]. *General and Comparative Endocrinology*, **110**, 276-89.
- Nadal, A., Ropero, A. B., Laribi, O., Maillet, M., Fuentes, E. & Soria, B. 2000. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11603-8.

- Naftolin, F., Horvath, T. L., Jakab, R. L., Leranth, C., Harada, N. & Balthazart, J. 1996. Aromatase Immunoreactivity In Axon Terminals Of the Vertebrate Brain - an Immunocytochemical Study On Quail, Rat, Monkey and Human Tissues. *Neuroendocrinology*, **63**, 149-155.
- Nagahama, Y. 1997. $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation- inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids*, **62**, 190-196.
- Nagahama, Y. & Adachi, S. 1985. Identification of a maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Developmental Biology*, **109**, 428-435.
- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tokumoto, T. & Katsu, Y. 1995. Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Current Topics in Developmental Biology*, **30**, 103-45.
- Nagl, S., Tichy, H., Mayer, W. E., Samonte, I. E., McAndrew, B. J. & Klein, J. 2001. Classification and phylogenetic relationships of African tilapiine fishes inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **20**, 361-374.
- Nagoshi, M. 1987. Survival of Broods under Parental Care and Parental Roles of the Cichlid Fish, *Lamprologus Toae*, in Lake Tanganyika. *Japanese Journal of Ichthyology*, **34**, 71-75.
- Neat, F. C., Huntingford, F. A. & Beveridge, M. M. C. 1998. Fighting and assessment in male cichlid fish: the effects of asymmetries in gonadal state and body size. *Animal behaviour*, **55**, 883-891.
- Neat, F. C. & Mayer, I. 1999. Plasma concentrations of sex steroids and fighting in male *Tilapia zillii*. *Journal of Fish Biology*, **54**, 695-697.
- Nebert, D. W. & Feyereisen, R. 1993. Evolutionary argument for a connection between drug metabolism and signal transduction. In: *Cytochrome P450 - Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology* (Ed. by Lechner, M. C.), pp. 3-13. Lisbon - Portugal: John Libbey Eurotext.

- Neil, S. J. 1984. Field studies on the behavioral ecology and agonistic behavior of *Cichlasoma meeki* (Pisces: Cichlidae). *Env. Biol. Fish*, **10**, 59-68.
- Nelissen, M. H. J. 1978. Sound production by some Tanganyikan cichlid fishes and a hypothesis for the evolution of the r communication mechanisms. *Behaviour*, **64**, 137-147.
- Nelson, L. R. & Bulun, S. E. 2001. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol*, **45**, S116-24.
- Nestler, J. E. 1987. Modulation of aromatase and P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme activities of human placental cytotrophoblasts by insulin and insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, **121**, 1845-52.
- Nicholas, K. B., Jr., N. H. B. & Deerfield, D. W. I. 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEWNEWS*, **4**, 14.
- Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M. & Gustafsson, J. A. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews*, **81**, 1535-65.
- Nishihara, E., Nagayama, Y., Inoue, S., Hiroi, H., Muramatsu, M., Yamashita, S. & Koji, T. 2000. Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor alpha and beta in rat pituitary gland detected by immunohistochemistry. *Endocrinology*, **141**, 615-20.
- Nuttall, D. B. & Keenleyside, M. H. A. 1993. Mate choice by the male convict cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*; Pisces, Cichlidae). *Ethology*, **95**, 247-256.
- O'Donnell, L., Robertson, K. M., Jones, M. E. & Simpson, E. R. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev*, **22**, 289-318.
- Oliveira, R. F. 1995. Etologia social e endocrinologia comportamental da tilápia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae). pp. 488. Lisboa: Universidade de Lisboa.

- Oliveira, R. F. & Almada, V. C. 1998a. Androgenization of dominant males in a Cichlid fish: androgens mediate the social modulation of sexually dimorphic traits. *Ethology*, **104**, 841-858.
- Oliveira, R. F. & Almada, V. C. 1998b. Maternal Aggression During the Mouthbrooding Cycle in the Cichlid Fish, *Oreochromis mossambicus*. *Aggressive Behavior*, **24**, 187-196.
- Oliveira, R. F., Almada, V. C. & Canario, A. V. 1996. Social modulation of sex steroid concentrations in the urine of male cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Horm Behav*, **30**, 2-12.
- Oliveira, R. F., Almada, V. C., Goncalves, E. J., Forsgren, E. & Canario, A. V. M. 2001a. Androgen levels and social interactions in breeding males of the peacock blenny. *Journal of Fish Biology*, **58**, 897–908.
- Oliveira, R. F. & Canario, A. V. M. *in press*. Hormones and social behavior in cichlid fishes: a case study in the Mozambique tilapia. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*.
- Oliveira, R. F., Canario, A. V. M., Grober, M. S. & Serrão Santos, R. 2001b. Endocrine Correlates of Male Polymorphism and Alternative Reproductive Tactics in the Azorean Rock-Pool Blenny, *Parablennius sanguinolentus parvicornis*. *General and Comparative Endocrinology*, **121**, 278–288.
- Oliveira, R. F., Hirschenhauser, K., Carneiro, L. A. & Canario, A. V. M. 2002. Social modulation of androgen levels in male teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part B*, **132**, 203–215.
- Oliveira, R. F., Lopes, M., Carneiro, L. A. & Canario, A. V. 2001c. Watching fights raises fish hormone levels. *Nature*, **409**, 475.
- Orlando, E. F., Davis, W. P. & Guillette, L. J., Jr. 2002. Aromatase activity in the ovary and brain of the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) exposed to paper mill effluent. *Environ Health Perspect*, **110 Suppl 3**, 429-33.

- Pakdel, F., Le Gac, F., Le Goff, P. & Valotaire, Y. 1990. Full-length sequence and in vitro expression of rainbow trout estrogen receptor cDNA. *Molecular And Cellular Endocrinology*, **71**, 195-204.
- Pakdel, F., Metivier, R., Flouriot, G. & Valotaire, Y. 2000. Two estrogen receptor (ER) isoforms with different estrogen dependencies are generated from the trout ER gene. *Endocrinology*, **141**, 571-80.
- Panzica, G. C., Viglietti-Panzica, C. & Balthazart, J. 1996. The sexually dimorphic medial preoptic nucleus of quail: a key brain area mediating steroid action on male sexual behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **17**, 51-125.
- Parducz, A., Hajszan, T., Maclusky, N. J., Hoyk, Z., Csakvari, E., Kurunczi, A., Prange-Kiel, J. & Leranth, C. 2006. Synaptic remodeling induced by gonadal hormones: neuronal plasticity as a mediator of neuroendocrine and behavioral responses to steroids. *Neuroscience*, **138**, 977-85.
- Pasmanik, M. & Callard, G. V. 1985. Aromatase and 5 alpha-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol*, **60**, 244-51.
- Pasmanik, M. & Callard, G. V. 1988. Changes in brain aromatase and 5 α -reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology*, **122**, 1349-56.
- Patchev, V. K., Hayashi, S., Orikasa, C. & Almeida, O. F. 1995. Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation. *Faseb J*, **9**, 419-23.
- Patino, R. & Thomas, P. 1990. Effects of gonadotropin on ovarian intrafollicular processes during the development of oocyte maturational competence in a teleost, the Atlantic croaker: evidence for two distinct stages of gonadotropin control of final oocyte maturation. *Biol Reprod*, **43**, 818-27.

- Pavlidis, M., Greenwood, L., Mourot, B., Kokkari, C., Le Menn, F., Divanach, P. & Scott, A. P. 2000. Seasonal variations and maturity stages in relation to differences in serum levels of gonadal steroids, vitellogenin, and thyroid hormones in the common dentex (*Dentex dentex*). *Gen Comp Endocrinol*, **118**, 14-25.
- Pellegrini, E., Menuet, A., Lethimonier, C., Adrio, F., Gueguen, M. M., Tascon, C., Anglade, I., Pakdel, F. & Kah, O. 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *Gen Comp Endocrinol*, **142**, 60-6.
- Pelletier, G., Labrie, C. & Labrie, F. 2000. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol*, **165**, 359-70.
- Petrino, T. R., Lin, Y. W., Netherton, J. C., Powell, D. H. & Wallace, R. A. 1993. Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus* V.: purification, characterization, and metabolism of 17 alpha,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one by intact follicles and its role in oocyte maturation. *Gen Comp Endocrinol*, **92**, 1-15.
- Pettersson, K. & Gustafsson, J. A. 2001. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol*, **63**, 165-92.
- Pieau, C. 1996. Temperature variation and sex determination in reptiles. *Bioessays*, **18**, 19-26.
- Pieau, C., Dorizzi, M. & Richard-Mercier, N. 2001. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Exs*, 117-41.
- Pinillos, M., Delgado, M. & Scott, A. 2003. Seasonal changes in plasma gonadal steroid concentrations and gonadal morphology of male and female tench (*Tinca tinca*, L.). *Aquaculture Research*, **34**, 1181-1189.
- Pinter, J. & Thomas, P. 1999. Induction of ovulation of mature oocytes by the maturation-inducing steroid 17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in the spotted seatrout. *General and Comparative Endocrinology*, **115**, 200-209.

- Pinto, P. I. S., Passos, A. L., Martins, R. S., Power, D. M. & Canario, A. V. M. 2006. Characterization of estrogen receptor beta b in sea bream (*Sparus auratus*): Phylogeny, ligand-binding, and comparative analysis of expression. *General and Comparative Endocrinology*, **145**, 197-207.
- Planas, J. V., Athos, J., Goetz, F. W. & Swanson, P. 2000. Regulation of Ovarian Steroidogenesis In Vitro by Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone During Sexual Maturation in Salmonid Fish. *Biol Reprod*, **62**, 1262-1150.
- Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M., de Mones, A. & Fostier, A. 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Gen Comp Endocrinol*, **78**, 361-73.
- Raab, H., Beyer, C., Wozniak, A., Hutchison, J. B., Pilgrim, C. & Reisert, I. 1995. Ontogeny Of Aromatase Messenger Ribonucleic Acid and Aromatase Activity In the Rat Midbrain. *Molecular Brain Research*, **34**, 333-336.
- Rahman, M., Ohta, K., Yoshikuni, M., Nagahama, Y., Chuda, H. & Matsuyama, M. 2002. Characterization of ovarian membrane receptor for 17,20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Gen Comp Endocrinol*, **127**, 71-9.
- Reebs, S. G. 1994. Nocturnal mate recognition and nest guarding by female convict cichlids (Pisces, Cichlidae: *Cichlasoma nigrofasciatum*). *Ethology*, **96**, 303-312.
- Reis-Henriques, M. A., Ferreira, M., Silva, L. & Dias, A. 2000. Evidence for an involvement of vitellogenin in the steroidogenic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenic oocytes. *Gen Comp Endocrinol*, **117**, 260-7.
- Remage-Healey, L. & Bass, A. H. 2004. Rapid, hierarchical modulation of vocal patterning by steroid hormones. *J Neurosci*, **24**, 5892-900.
- Remage-Healey, L. & Bass, A. H. 2005. Rapid elevations in both steroid hormones and vocal signaling during playback challenge: a field experiment in Gulf toadfish. *Hormones and Behavior*, **47**, 297-305.

- Rinchard, J., Kestemont, P., Kuhn, E. R. & Fostier, A. 1993. Seasonal changes in plasma levels of steroid hormones in an asynchronous fish the gudgeon *Gobio gobio* L. (Teleostei, Cyprinidae). *Gen Comp Endocrinol*, **92**, 168-78.
- Robertson, K. M., O'Donnell, L., Jones, M. E. E., Meachem, S. J., Boon, W. C., Fisher, C. R., Graves, K. H., McLachlan, R. I. & Simpson, E. R. 1999. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (*cyp 19*) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 7986-7991.
- Robinson-Rechavi, M., Marchand, O., Escriva, H. & Laudet, V. 2001. An ancestral whole-genome duplication may not have been responsible for the abundance of duplicated fish genes. *Current Biology*, **11**, R458-R459.
- Rocha, M. J. & Reis-Henriques, M. A. 1996. Plasma and urine levels of C18, C19 and C21 steroids in an asynchronous fish, the tilapia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, **115**, 257-64.
- Ros, A., Canario, A., Couto, E., Zeilstra, I. & Oliveira, R. 2003. Endocrine correlates of intra-specific variation in the mating system of the St. Peter's fish (*Sarotherodon galilaeus*). *Hormones And Behavior*, **44**, 365-373.
- Roselli, C. E. 1995. Subcellular localization and kinetic properties of aromatase activity in rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **52**, 469-77.
- Roselli, C. E., Abdelgadir, S. E. & Resko, J. A. 1997. Regulation of aromatase gene expression in the adult rat brain. *Brain Res Bull*, **44**, 351-7.
- Roselli, C. E., Abdelgadir, S. E., Ronnekleiv, O. K. & Klosterman, S. A. 1998a. Anatomic distribution and regulation of aromatase gene expression in the rat brain. *Biol Reprod*, **58**, 79-87.
- Roselli, C. E., Horton, L. E. & Resko, J. A. 1985. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology*, **117**, 2471-7.

- Roselli, C. E., Klosterman, S. & Resko, J. A. 2001. Anatomic relationships between aromatase and androgen receptor mRNA expression in the hypothalamus and amygdala of adult male cynomolgus monkeys. *J Comp Neurol*, **439**, 208-23.
- Roselli, C. E. & Klosterman, S. A. 1998. Sexual differentiation of aromatase activity in the rat brain: effects of perinatal steroid exposure. *Endocrinology*, **139**, 3193-201.
- Roselli, C. E. & Resko, J. A. 2001. Cytochrome P450 aromatase (CYP19) in the non-human primate brain: distribution, regulation, and functional significance. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **79**, 247-53.
- Roselli, C. E., Resko, J. A. & Stormshak, F. 2003. Estrogen synthesis in fetal sheep brain: effect of maternal treatment with an aromatase inhibitor. *Biol Reprod*, **68**, 370-4.
- Roselli, C. E., Stormshak, F. & Resko, J. A. 1998b. Distribution and regulation of aromatase activity in the ram hypothalamus and amygdala. *Brain Res*, **811**, 105-110.
- Rosenfeld, C. S., Ganjam, V. K., Taylor, J. A., Yuan, X., Stiehr, J. R., Hardy, M. P. & Lubahn, D. B. 1998. Transcription and translation of estrogen receptor-beta in the male reproductive tract of estrogen receptor-alpha knock-out and wild-type mice. *Endocrinology*, **139**, 2982-7.
- Rosenfeld, C. S., Yuan, X., Manikkam, M., Calder, M. D., Garverick, H. A. & Lubahn, D. B. 1999. Cloning, sequencing, and localization of bovine estrogen receptor-beta within the ovarian follicle. *Biol Reprod*, **60**, 691-7.
- Rothbard, S., Moav, B. & Yaron, Z. 1987. Changes in steroid concentrations during sexual ontogenesis in tilapia. *Aquaculture*, **61**, 59-74.
- Rowland, W. J. 1978. Sound Production and Associated Behavior in the Jewel Fish, *Hemichromis bimaculatus*. *Behaviour*, **64**, 125-136.
- Sakamoto, H., Mezaki, Y., Shikimi, H., Ukena, K. & Tsutsui, K. 2003. Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell. *Endocrinology*, **144**, 4466-77.

- Saldanha, C. J. & Coomaringam, L. 2005. Overlap and co-expression of estrogen synthetic and responsive neurons in the songbird brain - a double-label immunocytochemical study. *General and Comparative Endocrinology*, **141**, 66-75.
- Saldanha, C. J. & Schlinger, B. A. 1997. Estrogen synthesis and secretion in the brown-headed cowbird (*Molothrus ater*). *Gen Comp Endocrinol*, **105**, 390-401.
- Saldanha, C. J., Tuerk, M. J., Kim, Y. H., Fernandes, A. O., Arnold, A. P. & Schlinger, B. A. 2000. Distribution and regulation of telencephalic aromatase expression in the zebra finch revealed with a specific antibody. *J Comp Neurol*, **423**, 619-30.
- Saligaut, C., Linard, B., Mananos, E. L., Kah, O., Breton, B. & Govoroun, M. 1998. Release of Pituitary Gonadotrophins Gth I and Gth II in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) - Modulation By Estradiol and Catecholamines. *General & Comparative Endocrinology*, **109**, 302-309.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sampath Kumar, R., Ijiri, S. & Trant, J. M. 2000. Changes in the expression of genes encoding steroidogenic enzymes in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary throughout a reproductive cycle. *Biol Reprod*, **63**, 1676-82.
- Sanghera, M. K., Simpson, E. R., McPhaul, M. J., Kozlowski, G., Conley, A. J. & Lephart, E. D. 1991. Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology*, **129**, 2834-44.
- Sar, M. & Welsch, F. 1999. Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology*, **140**, 963-71.
- Sawaguchi, S., Kagawa, H., Ohkubo, N., Hiramatsu, N., Sullivan, C. V. & Matsubara, T. 2006. Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. *Mol Reprod Dev*, **73**, 719-36.

- Sawyer, S. J., Gerstner, K. A. & Callard, G. V. 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *General and Comparative Endocrinology*, **147**, 108-117.
- Schlinger, B. A. & Arnold, A. P. 1991. Brain is the major site of estrogen synthesis in a male songbird. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 4191-4.
- Schlinger, B. A., Creco, C. & Bass, A. H. 1999. Aromatase activity in the hindbrain vocal control region of a teleost fish: divergence among males with alternative reproductive tactics. *Proceedings of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, **266**, 131-136.
- Schlinger, B. A., Fivizzani, A. J. & Callard, G. V. 1989. Aromatase, 5 alpha- and 5 beta-reductase in brain, pituitary and skin of the sex-role reversed Wilson's phalarope. *J Endocrinol*, **122**, 573-81.
- Schulz, R. W., van der Sanden, M. C., Bosma, P. T. & Goos, H. J. 1994. Effects of gonadotrophin-releasing hormone during the pubertal development of the male African catfish (*Clarias gariepinus*): gonadotrophin and androgen levels in plasma. *J Endocrinol*, **140**, 265-73.
- Schulz, R. W., Vischer, H. F., Cavaco, J. E. B., Santos, E. M., Tyler, C. R., Goos, H. J. T. & Bogerd, J. 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **129**, 407-417.
- Schumacher, M. & Balthazart, J. 1986. Testosterone-induced brain aromatase is sexually dimorphic. *Brain Res*, **370**, 285-93.
- Schumacher, M. & Balthazart, J. 1987. Neuroanatomical distribution of testosterone-metabolizing enzymes in the Japanese quail. *Brain Research*, **422**, 137-48.

- Scott, A. P. & Canario, A. V. 1990. Plasma levels of ovarian steroids, including 17 alpha,21-dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione and 3 alpha,17 alpha,21-trihydroxy-5 beta-pregnan-20-one, in female plaice (*Pleuronectes platessa*) induced to mature with human chorionic gonadotrophin. *Gen Comp Endocrinol*, **78**, 286-98.
- Scott, A. P. & Canario, A. V. 1992. 17 alpha,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulphate: a major new metabolite of the teleost oocyte maturation-inducing steroid. *Gen Comp Endocrinol*, **85**, 91-100.
- Scott, A. P., Canario, A. V. & Prat, F. 1990. Radioimmunoassay of ovarian steroids in plasmas of ovulating female sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Comp Endocrinol*, **78**, 299-302.
- Scott, A. P. & Canario, A. V. M. 1987. Status of oocyte maturation-inducing steroids in teleosts. In: *Proceedings of the 3rd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. (Ed. by Idler, D. R., Crim, L. W. & Walsh, J. M.), pp. 224-234. St John's, Newfoundland, Canada: Memorial University of Newfoundland.
- Scott, A. P. & Liley, N. R. 1994. Dynamics of excretion of 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulphate, and of the glucuronides of testosterone and 17 β -oestradiol, by urine of reproductively mature male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Biology*, **44**, 117-129.
- Scott, A. P., Sheldrick, E. L. & Flint, A. P. F. 1982. Measurement of 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in plasma of trout (*Salmo gairdneri*, Richardson): seasonal changes and response to salmon pituitary extract. *General and Comparative Endocrinology*, **46**, 444-451.
- Scott, A. P. & Sumpter, J. P. 1983. A comparison of the female reproductive cycles of autumn-spawning and winter-spawning strains of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Gen Comp Endocrinol*, **52**, 79-85.
- Scott, A. P., Sumpter, J. P. & Hardiman, P. A. 1983. Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Gen Comp Endocrinol*, **49**, 128-34.

- Scott, A. P., Wittames, P. R., Turner, R. J. & Canario, A. V. M. 1998. Plasma concentrations of ovarian steroids in relation to oocyte maturation and ovulation in female plaice sampled at sea. *Journal of Fish Biology*, **52**, 128-145.
- Semsar, K. & Godwin, J. 2003. Social influences on the arginine vasotocin system are independent of gonads in a sex-changing fish. *J Neurosci*, **23**, 4386-93.
- Sharpe, R. M. 1998. The roles of oestrogen in the male. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **9**, 371-377.
- Shen, P., Schlinger, B. A., Campagnoni, A. T. & Arnold, A. P. 1995. An atlas of aromatase mRNA expression in the zebra finch brain. *Journal of Comparative Neurology*, **360**, 172-184.
- Shimizu, A. 2003. Effect of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in a reared strain of the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) during different phases of its annual reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol*, **131**, 310-24.
- Shimizu, A., Aida, K. & Hanyu, I. 1994. Effects of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in an autumn-spawning bitterling, *Acheilognathus rhombea*, during different phases of its annual reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol*, **93**, 137-50.
- Shozu, M., Zhao, Y., Bulun, S. E. & Simpson, E. R. 1998. Multiple splicing events involved in regulation of human aromatase expression by a novel promoter, I.6. *Endocrinology*, **139**, 1610-7.
- Shughrue, P. J., Lane, M. V. & Merchenthaler, I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, **388**, 507-25.
- Silverman, H. I. 1978a. Effects of different levels of sensory contact upon reproductive activity of adult male and female *Sarotherodon (Tilapia) mossambicus* (Peters); Pisces: Cichlidae. *Animal Behaviour*, **26**, 1081-1090.

- Silverman, H. I. 1978b. The effects of visual social stimulation upon age at first spawning in the mouth-brooding cichlid fish *Sarotherodon (Tilapia) mossambicus* (Peters). *Animal Behaviour*, **26**, 1120-1125.
- Simpson, E., Rubin, G., Clyne, C., Robertson, K., O'Donnell, L., Jones, M. & Davis, S. 2000. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends Endocrinol Metab*, **11**, 184-8.
- Simpson, E. R., Ackerman, G. E., Smith, M. E. & Mendelson, C. R. 1981. Estrogen formation in stromal cells of adipose tissue of women: induction by glucocorticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 5690-4.
- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C. R., Michael, M. D. & et, a. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev*, **15**, 342-55.
- Simpson, E. R., Zhao, Y., Agarwal, V. R., Michael, M. D., Bulun, S. E., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Sun, T., Fisher, C. R., Qin, K. & Mendelson, C. R. 1997. Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res*, **52**, 185-214.
- Singh, S. & Singh, T. P. 1987. Seasonal profiles of sex steroids in blood plasma and ovarian tissue of *Clarias batrachus*. *Gen Comp Endocrinol*, **65**, 216-24.
- Sipahutar, H., Sourdain, P., Moslemi, S., Plainfosse, B. & Seralini, G. E. 2003. Immunolocalization of aromatase in stallion Leydig cells and seminiferous tubules. *J Histochem Cytochem*, **51**, 311-8.
- Smith, C. J. & Haley, S. R. 1987. Evidence of steroidogenesis in postovulatory follicles of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Cell Tissue Res*, **247**, 675-687.
- Smith, C. J. & Haley, S. R. 1988. Steroid profiles of the female tilapia, *Oreochromis mossambicus*, and correlation with oocyte growth and mouthbrooding behavior. *Gen Comp Endocrinol*, **69**, 88-98.

- Smith, J. S. & Thomas, P. 1991. Changes in hepatic estrogen-receptor concentrations during the annual reproductive and ovarian cycles of a marine teleost, the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. *Gen Comp Endocrinol*, **81**, 234-45.
- Socorro, S., Power, D. M., Olsson, P. E. & Canario, A. V. 2000. Two estrogen receptors expressed in the teleost fish, *Sparus aurata*: cDNA cloning, characterization and tissue distribution. *J Endocrinol*, **166**, 293-306.
- Sorensen, P. W., Goetz, F. W., Scott, A. P. & Stacey, N. E. 1991. Recent studies indicate that goldfish use mixtures of unmodified hormones and hormonal metabolites as sex pheromones. In: *Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (Ed. by Scott, A. P., Stumper, J. P., Kime, D. E. & Rolfe, M. S.), pp. 191-193. University of East Anglia, Norwich, U.K.: FishSymp 91Norwich, U.K.
- Sorensen, P. W., Murphy, C. A., Loomis, K., Maniak, P. & Thomas, P. 2004. Evidence that 4-pregnen-17,20beta,21-triol-3-one functions as a maturation-inducing hormone and pheromonal precursor in the percid fish, *Gymnocephalus cernuus*. *Gen Comp Endocrinol*, **139**, 1-11.
- Stacey, N. & Kobayashi, M. 1996. Androgen induction of male sexual behaviors in female goldfish. *Horm Behav*, **30**, 434-45.
- Stefano, A. V., Vissio, P. G., Paz, D. A., Somoza, G. M., Maggese, M. C. & Barrantes, G. E. 1999. Colocalization of GnRH binding sites with gonadotropin-, somatotropin-, somatolactin-, and prolactin-expressing pituitary cells of the pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, in vitro. *General and Comparative Endocrinology*, **116**, 133-139.
- Steinkampf, M. P., Mendelson, C. R. & Simpson, E. R. 1987. Regulation by follicle-stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P-450 in human granulosa cells. *Mol Endocrinol*, **1**, 465-71.

- Strüssmann, C. A., Calsina Cota, J. C., Phonlor, G., Higuchi, H. & Takashima, F. 1996a. Temperature effects on sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. *Environmental Biology of Fishes*, **47**, 143-154.
- Strüssmann, C. A., Moriyama, S., Hanke, E. F., Calsina Cota, J. C. & Takashima, F. 1996b. Evidence of thermolabile sex determination in pejerrey. *Journal of Fish Biology*, **48**, 643-651.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Tacon, P., Baroiller, J. F., Le Bail, P. Y., Prunet, P. & Jalabert, B. 2000. Effect of egg deprivation on sex steroids, gonadotropin, prolactin, and growth hormone profiles during the reproductive cycle of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *General & Comparative Endocrinology*, **117**, 54-65.
- Tchoudakova, A. & Callard, G. V. 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology*, **139**, 2179-89.
- Tchoudakova, A., Kishida, M., Wood, E. & Callard, G. V. 2001. Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **78**, 427-39.
- Tchoudakova, A., Pathak, S. & Callard, G. V. 1999. Molecular cloning of an estrogen receptor beta subtype from the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol*, **113**, 388-400.
- Terkatin-Shimony, A. & Yaron, Z. 1978. Estrogens and estrogenic effects in *Tilapia aurea* (Cichlidae, Teleostei). *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **18**, 1007-1012.
- Thomas, P., Dressing, G., Pang, Y., Berg, H., Tubbs, C., Benninghoff, A. & Doughty, K. 2006. Progestin, estrogen and androgen G-protein coupled receptors in fish gonads. *Steroids*, **71**, 310-6.

- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876-82.
- Tobet, S. A. & Hanna, I. K. 1997. Ontogeny of sex differences in the mammalian hypothalamus and preoptic area. *Cell Mol Neurobiol*, **17**, 565-601.
- Toda, K., Simpson, E. R., Mendelson, C. R., Shizuta, Y. & Kilgore, M. W. 1994. Expression of the gene encoding aromatase cytochrome P450 (CYP19) in fetal tissues. *Mol Endocrinol*, **8**, 210-7.
- Tomizawa, K., Katayama, H. & Nakayasu, H. 2001. A novel monoclonal antibody recognizes a previously unknown subdivision of the habenulo-interpeduncular system in zebrafish. *Brain Research*, **901**, 117-127.
- Tong, S. K., Chiang, E. F., Hsiao, P. H. & Chung, B. 2001a. Phylogeny, expression and enzyme activity of zebrafish cyp19 (P450 aromatase) genes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **79**, 299-303.
- Tong, S. K., Chiang, E. F., Hsiao, P. H. & Chung, B. C. 2001b. Phylogeny, expression and enzyme activity of zebrafish cyp19 (P450 aromatase) genes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **79**, 299-303.
- Trant, J. M., Thomas, P. & Shackleton, C. H. 1986. Identification of 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one as the major ovarian steroid produced by the teleost *Micropogonias undulatus* during final oocyte maturation. *Steroids*, **47**, 89-99.
- Tremblay, G. B., Tremblay, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Labrie, F. & Giguere, V. 1997. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol*, **11**, 353-65.
- Trewavas, E. 1982. Generic groupings of Tilapiini used in aquaculture. *Aquaculture*, **27**, 79-81.
- Trewavas, E. 1983. *Tilapiine fishes of the genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia*. London.: British Museum (Natural History).

- Trombka, D. & Avtalion, R. 1993. Sex Determination in Tilapia - A Review. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, **45**, 26-37.
- Tsai, C. L., Wang, L. H., Chang, C. F. & Kao, C. C. 2000. Effects of gonadal steroids on brain serotonergic and aromatase activity during the critical period of sexual differentiation in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J Neuroendocrinol*, **12**, 894-8.
- Tsai, C. L., Wang, L. H. & Fang, L. S. 2001. Estradiol and para-chlorophenylalanine downregulate the expression of brain aromatase and estrogen receptor-alpha mRNA during the critical period of feminization in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Neuroendocrinology*, **74**, 325-34.
- Tsubota, T., Nitta, H., Osawa, Y., Mason, J. I., Kita, I., Tiba, T. & Bahr, J. M. 1993. Immunolocalization of steroidogenic enzymes, P450scc, 3 beta-HSD, P450c17, and P450arom in the Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*) testis. *Gen Comp Endocrinol*, **92**, 439-44.
- Tsuruo, Y., Ishimura, K., Fujita, H. & Osawa, Y. 1994. Immunocytochemical localization of aromatase-containing neurons in the rat brain during pre- and postnatal development. *Cell Tissue Res*, **278**, 29-39.
- Tsuruo, Y., Ishimura, K., Hayashi, S. & Osawa, Y. 1996. Immunohistochemical localization of estrogen receptors within aromatase- immunoreactive neurons in the fetal and neonatal rat brain. *Anat Embryol (Berl)*, **193**, 115-21.
- Tsuruo, Y., Ishimura, K. & Osawa, Y. 1995. Presence of estrogen receptors in aromatase-immunoreactive neurons in the mouse brain. *Neurosci Lett*, **195**, 49-52.
- Tyler, C. R., Pottinger, T. G., Coward, K., Prat, F., Beresford, N. & Maddix, S. 1997. Salmonid follicle-stimulating hormone (GtH I) mediates vitellogenic development of oocytes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biol Reprod*, **57**, 1238-44.
- Vandepoele, K., De Vos, W., Taylor, J. S., Meyer, A. & Van de Peer, Y. 2004. Major events in the genome evolution of vertebrates: Paraneome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *PNAS*, **101**, 1638-1643.

- Vanderschueren, D., van Herck, E., Nijs, J., Ederveen, A. G., De Coster, R. & Bouillon, R. 1997. Aromatase inhibition impairs skeletal modeling and decreases bone mineral density in growing male rats. *Endocrinology*, **138**, 2301-7.
- Veney, S. & Wade, J. 2005. Post-hatching syrinx development in the zebra finch: an analysis of androgen receptor, aromatase, estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta mRNAs. *Journal Of Comparative Physiology A*, **191**, 97-104.
- Veney, S. L. & Rissman, E. F. 1998. Co-localization of estrogen receptor and aromatase enzyme immunoreactivities in adult musk shrew brain. *Horm Behav*, **33**, 151-62.
- Veney, S. L. & Rissman, E. F. 2000. Immunolocalization of androgen receptors and aromatase enzyme in the adult musk shrew brain. *Neuroendocrinology*, **72**, 29-36.
- Vermeirssen, E. L. & Scott, A. P. 1996. Excretion of free and conjugated steroids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence for branchial excretion of the maturation-inducing steroid, 17,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one. *Gen Comp Endocrinol*, **101**, 180-94.
- Villeneuve, D. L., Knoebel, I., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Hammermeister, D. E., Greene, K. J., Blake, L. S. & Ankley, G. T. 2006. Relationship between brain and ovary aromatase activity and isoform-specific aromatase mRNA expression in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, **76**, 353-368.
- Vockel, A., Prove, E. & Balthazart, J. 1990a. Effects of castration and testosterone treatment on the activity of testosterone-metabolizing enzymes in the brain of male and female zebra finches. *J Neurobiol*, **21**, 808-25.
- Vockel, A., Prove, E. & Balthazart, J. 1990b. Sex- and age-related differences in the activity of testosterone- metabolizing enzymes in microdissected nuclei of the zebra finch brain. *Brain Res*, **511**, 291-302.
- Wagner, C. K., Silverman, A. J. & Morrell, J. I. 1998. Evidence for estrogen receptor in cell nuclei and axon terminals within the lateral habenula of the rat: regulation during pregnancy. *J Comp Neurol*, **392**, 330-42.

- Wang, L. H. & Tsai, C. L. 2000. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Zoology*, **286**, 534-537.
- Wang, Y. F. & Gu, X. 2000. Evolutionary patterns of gene families generated in the early stage of vertebrates. *Journal of Molecular Evolution*, **51**, 88-96.
- Weaver, C. E. & Baum, M. J. 1991. Differential regulation of brain aromatase by androgen in adult and fetal ferrets. *Endocrinology*, **128**, 1247-54.
- Weil, C. & Marcuzzi, O. 1990. Cultured pituitary cell GtH response to GnRH at different stages of rainbow trout oogenesis and influence of steroid hormones. *General and Comparative Endocrinology*, **79**, 483-491.
- Weiler, I. J., Lew, D. & Shapiro, D. J. 1987. The *Xenopus laevis* estrogen receptor: sequence homology with human and avian receptors and identification of multiple estrogen receptor messenger ribonucleic acids. *Molecular Endocrinology*, **1**, 355-62.
- Weltzien, F. A., Andersson, E., Andersen, O., Shalchian-Tabrizi, K. & Norberg, B. 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, **137**, 447-77.
- Wennstrom, K. L. & Crews, D. 1995. Making males from females: the effects of aromatase inhibitors on a parthenogenetic species of whiptail lizard. *Gen Comp Endocrinol*, **99**, 316-22.
- Wickler, W. 1965. Signal value of the genital tassel in the male *Tilapia macrochir* Blgr. (Pisces, Cichlidae). *Nature*, **208**, 595-596.
- Wingfield, J., Hegner, R., Dufty, A. & Ball, G. 1990. The Challenge Hypothesis - Theoretical Implications For Patterns Of Testosterone Secretion, Mating Systems, And Breeding Strategies. *American Naturalist*, **136**, 829-846.
- Wingfield, J. C. 1984. Environmental and endocrine control of reproduction in the song sparrow, *Melospiza melodia*. II. Agonistic interactions as environmental information stimulating secretion of testosterone. *Gen. Comp. Endocrinol*, **56**,

417-424.

- Woods, I. G., Wilson, C., Friedlander, B., Chang, P., Reyes, D. K., Nix, R., Kelly, P. D., Chu, F., Postlethwait, J. H. & Talbot, W. S. 2005. The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes. *Genome Research*, **15**, 1307-14.
- Wullimann, M. F., Rupp, B. & Reichert, H. 1996. *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topical Atlas*. Basel: Birkhauser.
- Yamada, H., Satoh, R., Ogoh, M., Takaji, K., Fujimoto, Y., Hakuba, T., Chiba, H., Kambegawa, A. & Iwata, M. 2002. Circadian changes in serum concentrations of steroids in Japanese char *Salvelinus leucomaenis* at the stage of final maturation. *Zoolog Sci*, **19**, 891-8.
- Yanagisawa, Y. 1985. Parental strategy of the cichlid fish *Perissodus microlepis*, with particular reference to intraspecific brood "farming out". *Env. Biol. Fishes*, **12**, 241-249.
- Yanagisawa, Y. 1993. Long-term territory maintenance by female *Tropheus duboisi* (Cichlidae) involving foraging during the mouth-brooding period. *Ecol. Freshwater Fish*, **2**, 1-7.
- Yanagisawa, Y. & Nishida, M. 1991. The Social and Mating System of the Maternal Mouthbrooder *Tropheus moorii* (Cichlidae) in Lake Tanganyika. *Japanese Journal of Ichthyology*, **38**, 271-282.
- Yanagisawa, Y. & Ochi, H. 1991. Food Intake by mouthbrooding female of *Cyphotilapia frontosa* (Cichlidae) to feed both themselves and their young. *Environmental Biology of Fishes*, **30**, 353-358.
- Yaron, Z., Ilan, Z., Bogomolnoya, A., Blauer, Z. & Vermaak, J. R. 1983. Steroid hormones in two tilapia species: *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. In: *International Symposium on Tilapia Aquaculture* (Ed. by Fishelson, L. & Yaron, Z.), pp. 153-164. Nazareth, Israel, 8-13 May 1983: Tel Aviv University Press, Israel.

- Yueh, W. S., Thomas, P. & Chang, C. F. 2005. Identification of 17,20beta,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one as an oocyte maturation-inducing steroid in black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Gen Comp Endocrinol*, **140**, 184-91.
- Zhang, Y., Zhang, W., Zhang, L., Zhu, T., Tian, J., Li, X. & Lin, H. 2004. Two distinct cytochrome P450 aromatases in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): cDNA cloning and differential mRNA expression. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **92**, 39-50.
- Zhao, J., Mak, P., Tchoudakova, A., Callard, G. & Chen, S. 2001. Different catalytic properties and inhibitor responses of the goldfish brain and ovary aromatase isozymes. *Gen Comp Endocrinol*, **123**, 180-91.
- Zhao, Y., Mendelson, C. R. & Simpson, E. R. 1995a. Characterization of the sequences of the human CYP19 (aromatase) gene that mediate regulation by glucocorticoids in adipose stromal cells and fetal hepatocytes. *Mol Endocrinol*, **9**, 340-9.
- Zhao, Y., Nichols, J. E., Bulun, S. E., Mendelson, C. R. & Simpson, E. R. 1995b. Aromatase P450 gene expression in human adipose tissue. Role of a Jak/STAT pathway in regulation of the adipose-specific promoter. *J Biol Chem*, **270**, 16449-57.
- Zhu, Y., Rice, C. D., Pang, Y., Pace, M. & Thomas, P. 2003. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2231-6.
- Zohar, Y., Elizur, A., Sherwood, N. M., Powell, J. F., Rivier, J. E. & Zmora, N. 1995. Gonadotropin-releasing activities of the three native forms of gonadotropin-releasing hormone present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *General and Comparative Endocrinology*, **97**, 289-99.
- Zwain, I. H. & Yen, S. S. C. 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*, **140**, 3843-3852.

ANEXOS

ANEXO I – SOLUÇÕES

As soluções usadas nos protocolos descritos nos capítulos II, III e IV, e no anexo II são apresentadas por ordem alfabética no presente anexo. As soluções necessárias à preparação dos reagentes de trabalho são igualmente descritas no presente anexo.

ACETATO DE SÓDIO 3M, pH 5.2

Preparação de 100ml de solução:

24.6g de acetato de sódio (Merck)

Dissolver o acetato de sódio em 60ml de água bidestilada e ajustar o pH com ácido acético até 5.2. Ajustar o volume final da solução com água bidestilada até 100ml. Armazenar à temperatura ambiente.

ÁCIDO CÍTRICO 2M

Preparação de 100ml de solução:

42g ácido cítrico (Merck)

Dissolver em 100ml de água MilliQ. Autoclavar durante 20 minutos a 121°C e armazenar à temperatura ambiente.

ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRAACÉTICO TRATADO COM DEPC (EDTA, 0.2M E 0.5M)

Preparação de 100ml de solução:

7.6g EDTA (0.2M) (Sigma-Aldrich)

19g EDTA (0.5M)

Dissolver a quantidade adequada de EDTA para a molaridade desejada, em água DEPC (ver abaixo), ajustando o pH para 8.0 com hidróxido de sódio e misturando bem. Ajustar o volume final da solução até 100ml com água DEPC. Armazenar à temperatura ambiente.

ÁGUA TRATADA COM DIETIL PITOCARBONATO (ÁGUA DEPC)

Preparação de 100ml de solução:

Encher uma garrafa de Duran de 100ml com água MilliQ e adicionar 10 μ L de DEPC (dietil pirocarbonato, Sigma-Aldrich). Misturar vigorosamente e deixar repousar à temperatura ambiente durante pelo menos 1 hora antes de autoclavar durante 20 minutos a 121°C. Armazenar à temperatura ambiente.

CHAPS 2% (3-[3-COLAMIDPROPILO]DIMETILAMONIO]-1-PROPANESULFONATO)

Preparação de 100ml de solução:

2g CHAPS (Sigma-Aldrich)

Dissolver em 100ml de água estéril tratada com dietil pirocarbonato (ver acima) e armazenar à temperatura ambiente.

CHURCH-GILBERT (SOLUÇÃO DE HIBRIDAÇÃO PARA *NORTHERN BLOT*)

Preparação de 1l de solução:

2ml de EDTA 0.5M pH = 8.0

500ml de 0.5M de SPB

350ml de SDS 20%

Perfazer com água destilada até 1l de volume

CLORETO DE LÍTIO 4M (TRATADO COM DEPC)

Preparação de 100ml de solução:

16.96g de cloreto de lítio (Sigma-Aldrich)

Dissolver em 100ml de água DEPC (ver acima) e armazenar à temperatura ambiente.

HEPARINA (10MG.ML⁻¹)

Preparação de 100ml de solução:

100mg de heparina (Sigma-Aldrich)

Dissolver a heparina em 10ml de água MilliQ, aliquotar e armazenar a -20°C.

PARAFORMALDEÍDO 4% (PFA, PH 7.4), PARA FIXAÇÃO DE TECIDOS

Preparação de 100ml de solução:

4g de paraformaldeído (Sigma-Aldrich)

90ml de água estéril MilliQ

10 μ L de hidróxido de sódio (solução saturada)

Misturar o paraformaldeído em 90ml de água e aquecer a 65°C com agitação contínua numa *hotte* até o paraformaldeído se dissolver completamente. Deixar a solução arrefecer até à temperatura ambiente e adicionar 10ml de tampão fosfato 1M pH 7.4 estéril (PB, ver abaixo) e, se necessário, corrigir o pH até 7.4 com hidróxido de sódio. A solução de fixador pode ser armazenado durante 1 semana a 4°C.

PARAFORMALDEÍDO 4%, PARA HIBRIDAÇÃO *IN SITU*

Preparação de 100ml de solução:

Diluir 10.8ml de uma solução de paraformaldeído 37% (Sigma-Aldrich) com 89.2ml de tampão fosfato-tween (PTW, ver abaixo) e utilizar imediatamente.

PROTEINASE K – SOLUÇÃO *STOCK* (1MG.ML⁻¹)

Preparação de 100ml de solução:

10mg de proteinase K (Sigma-Aldrich, >30 U/mg)

Diluir a proteinase K em 10ml de água estéril. Aliquotar e armazenar a -20°C . A solução de trabalho ($0.01\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) deve ser preparada diluindo um volume adequado de solução *stock* com PTW (ver abaixo) e utilizada imediatamente.

SOLUÇÃO AQUOSA DE EOSINA Y 1%

Preparação de 100ml de solução:

1g de eosina Y (C.I. 45380, Sigma-Aldrich)

Dissolver a eosina em 100ml de água bidestilada e armazenar até utilização posterior.

SOLUÇÃO DE ALBUMINA DE SORO BOVINO (BSA, $10\text{MG}\cdot\text{ML}^{-1}$)

Preparação de 10ml de solução:

100mg de albumina de soro bovino (Randox, Irlanda)

Dissolver em 10ml de água estéril. Aliquotar e armazenar a -20°C .

SOLUÇÃO DE BLOQUEAÇÃO 1%

Preparação de 100ml de solução:

1g de reagente de bloqueação (Boehringer Mannheim GmbH; para solução a 1%)

Dissolver em 100ml de MAB (ver abaixo) a 65°C e mexer ocasionalmente. Arrefecer até à temperatura ambiente, aliquotar e armazenar a -20°C .

SOLUÇÃO DE CLORETO DE MAGNÉSIO 1M

Preparação de 100ml de solução:

20.33g de cloreto de magnésio, hexahidratado (Sigma-Aldrich)

Dissolver em 100ml de água bidestilada e armazenar à temperatura ambiente.

SOLUÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO 5M

Preparação de 100ml de solução:

29.25g de cloreto de sódio

Dissolver o cloreto de sódio em 100ml de água bidestilada. Armazenar à temperatura ambiente.

SOLUÇÃO DE DENHARDT 50X

Preparação de 100ml de solução:

1g albumina de soro bovino

1g ficol (Sigma-Aldrich)

1g polivinilpirrolidone (PVP, Sigma-Aldrich)

Dissolver durante a noite a 4°C, filtrar, aliquotar e armazenar a -20°C.

SOLUÇÃO DE HEMATOXILINA HARRIS

Preparação de 100ml de solução:

1g de hematoxilina (C.I.75290, Merck)

10g de sulfato de potássio e alumínio.12 H₂O (Merck)

0.25g de óxido de mercúrio (Merck)

4ml de ácido acético glacial

5ml de etanol absoluto

Dissolver a hematoxilina em 5ml de etanol absoluto. Dissolver o sulfato de potássio e alumínio em 100ml de água bidestilada, previamente aquecida. Combinar as soluções e ferver durante 4 minutos, remover do calor e adicionar o óxido de mercúrio, misturar bem e depois ferver durante 1 minuto ou até o corante adquirir a cor púrpura escura. Arrefecer

rapidamente a solução, debaixo de água corrente e adicionar 4ml de ácido acético glacial e filtrar. Imediatamente antes de utilizar, diluir 50:50 em etanol absoluto e filtrar a solução resultante. Armazenar a solução *stock* no escuro à temperatura ambiente.

SOLUÇÃO DE HIBRIDAÇÃO, PARA HIBRIDAÇÃO *IN SITU*

Preparação de 100ml de solução:

50ml de formamida desionizada (Sigma-Aldrich)

20ml de tampão SSC 20× estéril (ver abaixo)

2ml de solução de Denhardt 50× (ver acima)

2ml de torula de RNA de levedura (50mg.ml⁻¹, ver abaixo)

2ml de CHAPS 2% (ver acima)

1ml de heparina (10 mg.ml⁻¹, ver acima)

Misturar todos os reagentes e ajustar o pH até 6.0 com uma solução de ácido cítrico 2M (ver acima). Ajustar o volume final da solução resultante até 100ml com água DEPC estéril (ver acima). Aliquotar e armazenar a -20°C.

SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO 1% (KOH)

Preparação de 100ml de solução:

1g de hidróxido de potássio (pellets, Merck)

Dissolver o hidróxido de potássio em 100ml de água bidestilada. Armazenar à temperatura ambiente.

SOLUÇÃO TRIS-HCL 1M, pH 7.5 (OU pH 9.5)

Preparação de 100ml de solução:

12.114g de tris (tris(hidroximetil)aminometano)

Dissolver o tris em 60ml de água bidestilada e ajustar o pH até 7.5 ou 9.5 com ácido hidrocloreídrico concentrado ou hidróxido de sódio, respectivamente. Ajustar o volume final da solução até 100ml com água bidestilada. Armazenar à temperatura ambiente.

SOLUÇÃO TRIS-NACL (TRIS-HCL 100 mM, NACL 150 mM, pH 7.5)

Preparação de 100ml de solução:

10ml de solução tris-HCl 1M, pH 7.5 (ver acima)

3ml de solução de cloreto de sódio 5M (ver acima)

Misturar ambas as soluções e perfazer o volume até 100ml com água bidestilada e utilizar imediatamente.

SULFATO DODECIL DE SÓDIO 10% (SDS)

Preparação de 100ml de solução:

10g de sulfato dedocil de sódio (SDS, Merck)

Dissolver em água bidestilada sem agitação para evitar a formação de bolhas. Armazenar à temperatura ambiente.

TAMPÃO DE ÁCIDO MALICO (MAB; ÁCIDO MALICO 100mM, NACL 100mM, TWEEN-20 0.1%, pH 7.5)

Preparação de 100ml de solução:

1.161g de ácido málico (Sigma-Aldrich)

0.8775g de cloreto de sódio (Sigma-Aldrich)

Dissolver em água MilliQ e ajustar o pH até 7.5. Perfazer o volume até 100ml e autoclavar durante 20 minutos a 121°C. Deixar arrefecer até à temperatura ambiente e adicionar 100µl de tween-20. Armazenar à temperatura ambiente.

TAMPÃO DE HIBRIDAÇÃO, PARA *NORTHERN BLOT*

Preparação de 100ml de solução:

25ml de SSC 20x (ver abaixo)

10ml de solução de Denhardt 50× (ver acima)

1ml de solução de sulfato de sódio dodecil 10% (SDS, ver acima)

100µl de solução de torula de RNA de levedura (50mg.ml⁻¹, ver abaixo)

Misturar todos os reagentes e ajustar o volume da solução resultante até 100ml com água DEPC estéril (ver acima). Armazenar a -20°C.

TAMPÃO DE REVELAÇÃO PARA HIBRIDAÇÃO *IN SITU* (TRIS-HCL 100MM, NaCl 100MM, MgCl₂ 50MM, PH 9.5)

Preparação de 100ml de solução:

10ml de uma solução Tris-HCl 1M, pH 9.5 (ver acima)

2ml de uma solução de cloreto de sódio 5M (ver acima)

5ml de uma solução de cloreto de magnésio 1M (ver acima)

Misturar os devidos volumes das soluções, ajustar o volume até 100ml com água bidestilada e usar imediatamente.

TAMPÃO FOSFATO 1M pH 7.4 (PB), PARA A PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PFA

Preparação de 100ml de solução:

12.46g de hidrogeno-fosfato dissódico, di-hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck)

4.68g de di-hidrogeno fosfato de sódio, di-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck)

Dissolver os reagentes em 60ml de água MilliQ; ajustar o pH até 7.4 e perfazer o volume final da solução até 100ml. Autoclavar a solução durante 20 minutos a 121°C. Armazenar à temperatura ambiente.

TAMPÃO FOSFATO SALINO 10X pH 7.0 (PBS), PARA HIBRIDAÇÃO IN SITU E IMUNOCITOQUÍMICA

Preparação de 100ml de solução:

7.597g de cloreto de sódio

1.246g de hidrogeno-fosfato dissódico, di-hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

0.48g de dihidrogeno-fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Dissolver os reagentes em 60ml de água MilliQ; ajustar o pH até 7.0 e perfazer o volume final da solução até 100ml. Autoclavar a solução durante 20 minutos a 121°C. Armazenar a solução *stock* à temperatura ambiente.

Preparação de 100ml de **tampão PBS 1×**:

Diluir 10ml de tampão PBS 10x com 90ml de água DEPC (ver acima).

TAMPÃO FOSFATO-TRITON (PBST)

Preparação de 100ml de solução:

Adicionar 100 μL de triton-X (Sigma-Aldrich) a 100ml de PBS 1x (ver acima) e misturar

bem para dissolver completamente o triton-X.

TAMPÃO FOSFATO-TWEEN (PTW)

Preparação de 100ml de solução:

Adicionar 100 μ L de tween-20 a 100ml de PBS 1x (ver acima) e misturar bem para dissolver completamente o tween-20.

TAMPÃO TRIS-BORATO-EDTA 10x (TBE 10x)

Preparação de 100ml de solução:

10.8g de tris base (Sigma-Aldrich)

5.5g de ácido bórico (Sigma-Aldrich)

10ml de EDTA 0.5M pH 8.0 (ver acima)

Dissolver os sais em água bidestilada e ajustar o volume até 100ml. Autoclavar a solução durante 20 minutos a 121°C. Armazenar a solução *stock* à temperatura ambiente.

Para preparar 100ml de **tampão TBE 1x** diluir 10ml de tampão TBE 10x com 90ml de água bidestilada (para géis para correr amostras de DNA) ou água DEPC (para géis para correr amostras de RNA).

TAMPÃO TRIS SALINO 1x (TBS) pH 7.4

Preparação de 100ml de solução:

1.2114g de tris (tris(hidroximetil)aminometano, Merck)

0.8775g de cloreto de sódio

Dissolver os sais em água MilliQ e ajustar o pH até 7.4 com ácido hidrocloreídrico

concentrado (HCl) e perfazer o volume até 100ml. Autoclavar a solução durante 20 minutos a 121°C. Armazenar à temperatura ambiente.

TAMPÃO SODIUM CHLORIDE-SODIUM CITRATE 20x (SSC 20x)

Preparação de 100ml de solução:

17.53g de cloreto de sódio

8.82g de citrato de sódio

Dissolver os reagentes em 60ml de água bidestilada. Ajustar o pH até 7.0 com NaOH 5N e perfazer o volume até 100ml com água bidestilada. Autoclavar a solução durante 20 minutos a 121°C. Armazenar a solução *stock* à temperatura ambiente.

Para preparar 100ml de **SSC 2x** diluir 10ml de SSC 20x em 90ml de água estéril. Todas as outras concentrações de tampão SSC devem ser preparadas como descrito, utilizando a quantidade adequada de solução concentrada.

TORULA RNA DE LEVEDURA (50MG.ML⁻¹)

Preparação de 100ml de solução:

0.5g de torula de RNA de levedura (Roche diagnostics)

Adicionar o RNA de levedura a 10ml de água bidestilada e a 50µl de solução saturada de hidróxido de sódio e aquecer a solução até aproximadamente 60°C até se dissolver completamente. Deixar a solução arrefecer, preparar alíquotas e armazenar a -20°C.

ANEXO II – MEIOS DE CULTURA E PREPARAÇÃO DE CÉLULAS**LB AGAR/AMPICILINA**

NaCl 10g/l

Triptona 10g/l

Extracto de levedura 5g/l

Agar 20g/l

Adicionar água desionizada até perfazer um volume final de 1l. Ajustar o pH até 7.0 com 5N NaOH, autoclavar, arrefecer até 50°C, adicionar 1ml de Ampicilina (50mg/ml) e distribuir por placas de Petri.

LB BROTH

NaCl 10g/l

Triptona 10g/l

Extracto de levedura 5g/l

Adicionar água desionizada até perfazer um volume final de 1l. Ajustar o pH até 7.0 com 5N NaOH e autoclavar.

MOPS (10x)

20.9g MOPS

2.05g de acetato de sódio anidro

12.5ml de EDTA 0.4M

Adicionar água duas vezes destilada até perfazer um volume final de 500ml, ajustar o pH até 7.0 com água NaOH 5N e autoclavar

A preparação de MOPS 1x implica a diluição de um para dez do stock original.

NZY AGAR

5g de NaCl

2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5g de extracto de levedura

10g de NZ amina (*casein hydrolyzate*)

15g de agar

Adicionar água bidestilada até perfazer um volume final de 1l, ajustar o pH até 7.5 com NaOH, autoclavar e distribuir por placas de Petri.

NZY BROTH

5g de NaCl

2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5g de extracto de levedura

10g de NZ amina (*casein hydrolyzate*)

Adicionar água bidestilada até perfazer um volume final de 1l, ajustar o pH até 7.5 com NaOH, autoclavar.

NZY TOP AGAR

Preparar 1l de NZY broth, adicionar agarose para 7% (p/v) e autoclavar.

TAMPÃO SM

5.8g de NaCl

2.0g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

50ml de Tris-HCl 1M (pH 7.5)

5ml de gelatina 2%

Adicionar água bidestilada até perfazer um volume final de 1l e autoclavar.

PREPARAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS *E. COLI* (XL1BLUE MRF') COMPETENTES

100µl de uma cultura crescida durante a noite (20ml) inoculada com uma única colónia de XL1B MRF' foram inoculados em 10ml de meio LB fresco e crescidos a 37°C com agitação orbital, durante 3h, centrifugadas a 2000rpm durante 10 minutos e o precipitado resultante ressuscitado em 5ml de CaCl₂ 0.1M. As células foram mantidas no gelo durante 30 minutos, centrifugadas a 2000rpm durante 10 minutos e o precipitado resultante ressuscitado em 1ml de CaCl₂ 0.1M.

O plasmídeo foi adicionado a uma alíquota (200lµ), incubado no gelo durante 35 minutos, aquecido a 42°C durante 2 minutos e plaqueado.

PREPARAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS *E. COLI* (XL1BLUE MRF') HOSPEDEIRAS

100µl de uma cultura crescida durante a noite (20ml) inoculada com uma única colónia de XL1B MRF' foram inoculados em 10ml de meio LB fresco e crescidos a 37°C com agitação orbital, durante 3h, centrifugadas a 2000rpm durante 10 minutos e o precipitado resultante ressuscitado em 5ml de MgSO₄ 0.1M.e aliqotado. Foi adicionado 1-30µl de fago (biblioteca de cDNA), incubado a 37°C durante 15 minutos, misturado com 10ml de NZY top agar e distribuído por placas NZY agar.

PREPARAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS *E. COLI* (SOLR) HOSPEDEIRAS

100µl de uma cultura crescida durante a noite (20ml) inoculada com uma única colónia de SolR foram inoculados em 10ml de meio LB fresco e crescidos a 37°C com agitação orbital, durante 3h, centrifugadas a 2000rpm durante 10 minutos e o precipitado resultante ressuscitado em 5ml de MgSO₄ 0.1M.e aliqotado.

ANEXO III – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS COMPLEMENTARES

PREPARAÇÃO DO GEL DE AGAROSE EM TBE

A preparação de géis de agarose para electroforese foi realizada de modo idêntico em todos os procedimentos. O volume das soluções de agarose preparadas foi ajustado de forma a ser apropriado para o tamanho do molde de gel utilizado e para a concentração do gel pretendido. Para um gel de agarose 1% de 50ml (molde 10.5×7.5×1.5cm):

A agarose (0.5g) foi pesada e adicionada a 50ml de tampão TBE1x (anexo I). A mistura foi aquecida num microondas ou numa placa de aquecimento até a agarose se ter dissolvido completamente e a solução estar transparente. A solução foi deixada arrefecer até aproximadamente 55°C, foram adicionados 20µl de uma solução de brometo de etídio (0.5mg.ml⁻¹), misturou-se a solução, deitou-se para dentro do molde de gel e deixou-se solidificar. A quantidade de agarose utilizada foi variada de acordo com a percentagem final de agarose requerida.

PREPARAÇÃO DO GEL PARA *NORTHERN BLOT* (200ML)

3g de agarose

150ml de água DEPC

20ml de MOPS 10x

Dissolver por fervura, arrefecer até 60°C e adicionar 30ml de Solução de formaldeído 37%, misturar bem.

SOLUÇÃO DESNATURANTE

500µl formamida desionizada

100µl de MOPS 10x

150µl de formaldeído

4 μ l de brometo de etídio (10mg/ml)

SOLUÇÕES E TEMPO DE TRATAMENTO (MINUTOS) PARA INCLUSÃO DOS TECIDOS EM BLOCOS DE PARAFINA:

As amostras (tecidos e larvas) foram colocadas em cassetes histológicas apropriadas e imersas numa solução de 70% DEPC em etanol, num processador automático de tecidos (Leica TP 1020). O seguinte programa automático de desidratação, aclaramento e inclusão foi definido conforme as instruções do instrumento e consistiu em:

Tratamento	Tempo (minutos)
Desidratação em Etanol 70%	10
Desidratação em Etanol 95%	30
Desidratação em Etanol 95%	30
Desidratação em Etanol 100%	60
Desidratação em Etanol 100%	60
Aclaramento em Etanol 100%: Xilol (1:1)	60
Aclaramento em Xilol	60
Aclaramento em Xilol	90
Inclusão em Xileno:Parafina (1:1)	120
Inclusão em Parafina	120

Uma vez terminado o programa, prepararam-se os blocos de parafina com o processador de materiais utilizando moldes de tamanho apropriado.

PREPARAÇÃO DE LÂMINAS COM APES (AMINOPROPILTRIETOXISILANE) PARA MONTAGEM DE SECÇÕES DE PARAFINA

Um conjunto de lâminas foi tratado de cada vez, utilizando um suporte de lâminas de vidro que comporta 20-50 lâminas.

As lâminas foram lavadas por imersão numa solução de 1% ácido/álcool (1% ácido clorídrico concentrado, 70% etanol, 29% água destilada, v/v), durante 30 minutos, com

agitação ocasional. As lâminas foram removidas, deixou-se escorrer o excesso de solução acídica e em seguida foram lavadas debaixo de água da torneira corrente durante 1-2 minutos, tendo sido depois brevemente imersas em água destilada. As lâminas foram secas numa estufa a 37°C.

As lâminas foram cobertas com aminopropiltrietoxisilane (APES, Sigma-Aldrich) por imersão em acetona, durante 10 minutos e em seguida numa solução de APES em acetona, durante 5 minutos. Deixou-se escorrer o excesso de solução de APES, depois do que as lâminas foram lavadas em água destilada, secas a 37°C, arrumadas em caixas e armazenadas à temperatura ambiente até utilização posterior.

DESIDRATAÇÃO E ACLARAMENTO DE SECÇÕES DE TECIDOS PARA OBTENÇÃO DE PREPARAÇÕES DEFINITIVAS

Após a conclusão dos respectivos tratamentos (hibridação *in situ*, imunocitoquímica e colorações simples), foram feitas preparações definitivas por desidratação, aclaramento (ver tabela abaixo), montagem em DPX (FLUKA) e cobertura com uma lamela de vidro.

Tratamento	Tempo (minutos)
Desidratação em Etanol 70% (2×)	5
Desidratação em Etanol 95% (2×)	5
Desidratação Etanol 100% (2×)	5
Aclaramento Xilol 10 (2×)	10

