



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Mecanismos moleculares e respectivas vias de sinalização intracelulares envolvidas na regulação da produção de esteróides sexuais em machos de tilápia mossambica (*Oreochromis mossambicus*).

Filipa Alexandra Martins Gonçalves

Tese de mestrado
Mestrado em Aquacultura e Pescas
Área de especialização em Aquacultura

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Doutora Rute Martins
Doutor Adelino Vicente Mendonça Canário

2012

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Mecanismos moleculares e respectivas vias de sinalização
intracelulares envolvidas na regulação da produção de esteróides
sexuais em machos de tilápia mossambica (*Oreochromis mossambicus*).**

Filipa Alexandra Martins Gonçalves

Mestrado em Aquacultura e Pescas
Área de especialização em Aquacultura

Orientadores: Doutora Rute Martins

Doutor Adelino Vicente Mendonça Canário

2012

Mecanismos moleculares e respectivas vias de sinalização intracelulares envolvidas na regulação da produção de esteróides sexuais em machos de tilápia mossambica (*Oreochromis mossambicus*).

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Filipa Alexandra Pinheiro Gonçalves

Copyright

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por outro qualquer meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Adelino Canário pela oportunidade dada para eu fazer esta tese, e por toda a sua disponibilidade e compreensão.

À Doutora Rute, que mais do que uma orientadora, foi uma mestre por tudo aquilo que me ensinou, sempre com o maior carinho e dedicação. Por nunca ter desistido de mim, e acima de tudo por me mostrar que eu era capaz de chegar ao fim deste trabalho!

A todas as pessoas do laboratório 2.28 da FCT, por toda a ajuda que me deram. Um agradecimento muito especial á Elsa por toda a paciência em me ensinar a fazer RIAs, e por toda a simpatia que sempre teve.

Ao meu namorado, por ter estado a meu lado, por todo o seu amor e apoio e por não me ter deixado desistir!

À minha melhor amiga Helena, por todas as vezes que foi tomar café comigo (e foram muitas) durante os tempos de espera em laboratório, pelas longas conversas e por todo o apoio!

À minha família porque sem eles nada era possível! Por todo o amor, carinho e apoio! Mesmo estando longe foram um apoio enorme, encorajaram-me a continuar quando a vontade de o fazer era mínima! Por terem estado sempre ao meu lado em todos os momentos!

A todos vocês o meu muito obrigado por terem feito parte deste período tão importante da minha vida!

RESUMO

Os comportamentos agressivos entre machos, originam um rápido aumento nos níveis de androgénios, levando a uma necessidade de clarificar os mecanismos que permitem esta mudança. Neste trabalho foi analisada a influência das vias de sinalização da enzima proteína quinase dependente de cAMP (cAMP-PKA), proteína quinase C (PKC) e o complexo cálcio-calmodulina (Ca^{2+} -CaM) na produção de androgénios em testículos de tilápia (*Oreochromis mossambicus*). Esta análise foi feita incubando fragmentos de testículos com agonistas e antagonistas das vias referidas e analisando os níveis dos androgénios, pelo método de radioimunoensaio. Dada a influência do gene SF1 na regulação das enzimas envolvidas na esteroidogénese, e da sua relação com o gene DAX1, neste trabalho foi ainda analisada a expressão dos referidos genes. Pretendeu-se assim verificar se a sua expressão poderia explicar o efeito das manipulações das vias na produção de esteróides. O nível de expressão de ambos os genes foi analisado por PCR semi-quantitativo, utilizando como gene de referência o RNA ribossomal 18S.

Os resultados obtidos para a análise da produção de esteróides revelam que, os níveis basais de testosterona e 11-cetotestosterona (11-KT) não dependem da via PKC. Contudo, estão dependentes da via cAMP-PKA, pois verifica-se uma diminuição dos níveis de ambos, quando os tecidos foram incubados com um inibidor da PKA, o SQ22536. Apesar da via PKC não ser necessária para manter os níveis basais, a indução dos níveis de androgénios pela cAMP-PKA está dependente da via PKC.

Em relação à expressão dos genes SF1 e DAX1, os resultados obtidos neste trabalho não puderam ser interpretados pois a expressão do gene 18S, gene de referência, não foi constante em todos os tratamentos. Assim, será necessário, em estudos futuros, repetir a análise da expressão dos genes referidos mas utilizando outros genes de referência que não o 18S.

Palavras-chave: androgénios, cAMP-PKA, PKC, CaM, SF1, DAX1.

ABSTRACT

Aggressive behavior between males, produce a rapid increase in levels of androgens, leading to a need to clarify the mechanisms that allow this change. This work analyzed the influence of cAMP-dependent protein kinase (cAMP-PKA), protein kinase C (PKC) and Ca²⁺-CaM complex (Ca²⁺-CaM) signaling pathways in the production of androgens in the testes of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). This analysis was done by incubating testes fragments with agonists and antagonists of such pathways, and by analyzing the levels of androgens, by RIA (radioimmunoassay). Given the influence of SF1 gene in the regulation of the enzymes involved in steroidogenesis, and its relationship with the gene DAX1, we have also analyzed the expression of the genes concerned. This is intended to verify if their expression could explain the effect of manipulation of the pathways in the production of steroids. The expression level of both genes was analyzed by semi-quantitative PCR, using the 18S as a reference gene.

The results of the steroids production analysis has shown that the basal levels of testosterone and 11-ketotestosterone (11-KT) are not PKC pathway dependent. However, they are cAMP- PKA dependent since there is a decrease in the levels of both androgens, when the tissues were incubated with an inhibitor of PKA, the SQ22536. While the PKC pathway is not necessary to maintain the basal levels, the levels of androgens induction by the cAMP- PKA pathway are strongly dependente on PKC.

With respect to the expression of SF1 and DAX1 genes, we are not able to link the expression data of these genes to the steroid levels since we the expression of the 18S was not constant across the treatments groups. Nonetheless, in future studies, the expression of these genes should be analysed, although different reference genes should be chosen.

Keywords: androgens, cAMP-PKA, PKC, Calmodulin, SF1, DAX1.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	11
2. MÉTODOS	20
2.1 Manutenção dos animais	20
2.2 Experiências <i>in vitro</i>	20
2.3 Efeitos das vias na produção de androgénios).....	21
a) Efeito da cAMP-PKA na produção de androgénios.....	21
b) Efeito da PKC na produção de androgénios	21
c) Efeito da Ca ²⁺ -CaM na produção de androgénios	22
d) Cruzamento de vias	22
2.4 Radioimunoensaios	22
2.5 Extracção de RNA total	23
2.5.1 Análise quantitativa e qualitativa do RNA	24
2.6 Síntese de cDNA	24
2.7 Reacção de polimerização em cadeia	25
2.8 Quantificação	25
2.9 Estatística	25
3. RESULTADOS	27
3.1 Influência da via de cAMP-PKA no processo de esteroidogénese	27
3.2 Influência da via PKC no processo de esteroidogénese	28
3.3 Envolvimento de várias vias de sinalização em simultâneo no processo de esteroidogénese.....	29
a) Via cAMP-PKA e Ca ²⁺ -CaM.....	29
b) Via PKC e Ca ²⁺ -CaM.....	30
c) Via PKC e PKA	31
3.4 Envolvimento de várias vias de sinalização na expressão dos genes SF1, DAX1 e 18S.....	32
Expressão do gene DAX1.....	32
Expressão do gene SF1	32
Expressão do gene 18S	33
4. DISCUSSÃO	34
5. BIBLIOGRAFIA	38

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabelas

Tabela 2.1. Composição da mistura de PCR e das condições de PCR para o 18S, DAX1 e SF1 utilizadas na experiência. 26

Figuras

Figura 1.1 Esquema das vias de estimulação (+) e inibição (-) reprodutiva e maturação, consistindo em factores ou substâncias que regulam estruturas ou comportamentos em peixes teleósteos adultos. GnRH: hormona libertadora de gonadotrofinas; GtH: gonadotrofina I e II. (Adaptado de Arukwe, 2001). 13

Figura 1.2 Activação da transcrição de gene por aumento do cAMP. A ligação da hormona ao receptor associado à proteína G, permite a activação da adenilato ciclase e aumento do cAMP que activa a quinase A no citosol. Após activação a proteína quinase A passa para o núcleo e catalisa a fosforilação da proteína reguladora do gene. (Fonte: Adaptado de Alberts *et al.*, 1998). 14

Figura 1.3 Vias de sinalização intracelulares. O diagrama representa as vias das proteínas G ligadas a receptores via cAMP. A vermelho a interconexão reguladora e a amarelo as quinases. (Fonte: Adaptado de Alberts *et al.*, 1998). 15

Figura 1.4 Via esteroidogénica desde colesterol até os principais esteróides sexuais envolvidos na diferenciação sexual da gónada. A verde as enzimas esteroidogénicas, a amarelo as progesteronas, a azul os androgénios e a vermelho os estrogénios. A azul-escuro e vermelho escuro os androgénios e estrogénios com maior potência relativa. (Fonte: Adaptado de Piferrer, 2011). 17

Figura 2.1 Esquema representativo da placa de cultura utilizada nas incubações *in vitro* e respectivos tratamentos. Cada poço continha 1ml de meio Cortland e o respectivo tratamento. W7 ([N-(6-aminohexyl)-5-cloro-1-naftaleno-sulfonamidas]); FK

(forskolina); IBMX (3-isobutil-1-metilxantina); PMA (forbol 12-miristato 13-acetato); SQ22536 (9-(tetrahydro-2-furanyl)-9H-purina-6-amina); U73122 ([1-(6-((17 β -3-methoxyestr-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)-hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione])). O controle continha apenas 1ml de meio Cortland. O tempo de incubação para todos os tratamentos foi de 8h. 21

Figura 2.2 Esquema representativo dos cartuchos e cuvetes do kit da Promega, utilizados para extracção de RNA na Maxwell. Cada poço continha: #1 tampão de lise ao qual foi adicionado amostra, #2 Partículas paramagnéticas, #3 Solução A de lavagem de RNA, #4 Solução de lavagem, #5 Solução B de lavagem de RNA, #6 Solução B de lavagem de RNA, #7 Solução B de lavagem de RNA. 24

Figura 3.1 Efeito da forskolina e SQ22536 nos níveis de esteróides nos testículos. As diferentes letras denotam a diferença estatística ($p < 0,05$). 27

Figura 3.2 Efeito do PMA e U73122 nos níveis de esteróides nos testículos. Não existe diferença estatística entre os tratamentos e o controle. 28

Figura 3.3 Efeito da forskolina e FK/W7 nos níveis de esteróides nos testículos. As diferentes letras denotam a diferença estatística ($p < 0,05$) 29

Figura 3.4 Efeito do PMA e PMA/W7 nos níveis de esteróides nos testículos. As diferentes letras denotam a diferença estatística ($p < 0,05$) 30

Figura 3.5 Efeito da forskolina, PMA, FK e U73122/FK nos níveis de esteróides nos testículos. As diferentes letras denotam a diferença estatística ($p < 0,05$) 31

Figura 3.6 Efeito dos vários tratamentos na expressão do gene DAX1. 32

Figura 3.7 Efeito dos vários tratamentos na expressão do gene SF1. 32

Figura 3.8 Efeito dos vários tratamentos na expressão do gene 18S. As diferentes letras denotam a diferença estatística ($p < 0,05$). 33

Figura 4.1 Esquema sugerido, em função dos resultados do presente trabalho, para as vias de sinalização intracelulares, complementando o esquema de Alberts *et al.*, 1998. O diagrama representa as vias das proteínas G ligadas a receptores. A cor-de-rosa a interconexão reguladora e a amarelo as quinases. A seta vermelha (tracejada) representa a relação entre as vias cAMP-PKA e PK.

36

1. INTRODUÇÃO

Os peixes são modelos interessantes para estudar a base molecular da variação do comportamento, devido à diversidade de ambientes que enfrentam, sistemas sociais que têm (St-Cyr & Aubin-Horth, 2009), e aos seus complexos sistemas de acasalamento. A competição ao nível reprodutivo dos indivíduos masculinos, variável entre espécies e até mesmo dentro da mesma espécie (Fessehayé *et al.*, 2006), pode influenciar o sucesso da reprodução e conseqüentemente o tamanho da população (Bekkevold *et al.*, 2002). Um dos grupos que é muitas vezes objecto em diversos estudos, nomeadamente comportamentais, é o grupo dos ciclídeos (Beeching, 1997).

Nos ciclídeos africanos a reprodução dos machos tem como base a regulação social, de tal forma que a dominância e comportamento territorial são sinónimos de reprodução. Os machos dominantes são territoriais, agressivos, activamente reprodutivos, coloridos e de crescimento lento, enquanto os subordinados não são territoriais, são inactivamente reprodutivos, com gónadas regressivas e rápido crescimento (Hofmann *et al.*, 1999; White *et al.*, 2002).

As tilápias são um grupo muito vasto de espécies de peixes teleósteos pertencentes à família Cichlidae (Trewavas, 1983). A tilápia aplica-se aos géneros *Tilapia*, *Serotherodon* e *Oreochromis*, que apresentam comportamentos reprodutores distintos (Trewavas, 1983).

Oreochromis mossambicus (Peters, 1852) é originária de Moçambique, e uma das principais espécies utilizadas em laboratório devido a um conjunto de características. A tolerância a condições de cativeiro e grandes amplitudes de temperatura e osmolaridade, elevadas taxas de reprodução e comportamentos reprodutores elaborados são algumas dessas características (Cruz, 2006). Tal como é característico do género *Oreochromis*, esta espécie apresenta dimorfismo sexual acentuado. Os machos reprodutores apresentam uma coloração negra intensa ao longo de todo o corpo, apenas com a região submandibular branca, e os bordos das barbatanas caudal anal e dorsal com um tom vermelho (Trewavas, 1983).

A estrutura social e seus espaços compõem um sistema no qual os machos com a unidade reprodutiva mais forte ocupam os territórios e atraem as fêmeas. A agressão

territorial é mostrada principalmente por exibição e conflitos simbólicos e raramente por lutas verdadeiras que levam a feridas (Jalabert & Zohar, 1982)

Os comportamentos agressivos podem ser componentes de respostas sexuais, defesa de território, do ninho ou acasalamento, mas podem também ocorrer em contexto não reprodutivo, como competição por alimento e posição na dominância hierárquica (Liley & Stacey, 1983). Em geral, os indivíduos territoriais e dominantes têm níveis mais elevados de androgénios do que indivíduos não dominantes (Oliveira *et al.*, 2002), mas a relação entre o nível de androgénios (Parikh *et al.*, 2006) e o estatuto social está dependente também de outros factores (Maruska & Fernald, 2010).

Quando grupos de machos são formados, existem mudanças drásticas nas concentrações de esteróides, relacionado com a hierarquia social que foi imediatamente estabelecida. O aumento da concentração de androgénios pode ser explicado pela necessidade de manter os níveis de agressividade elevados durante os encontros entre machos (Oliveira *et al.*, 1996).

O sucesso reprodutivo de um indivíduo adulto está dependente da ontogénese da gónada, um processo complexo iniciado cedo na vida do indivíduo, no qual uma gónada indiferenciada se diferencia num ovário ou num testículo (Strüssmann & Nakamura, 2002). As gónadas de todos os vertebrados são compostas por células somáticas (estruturais) e células germinais (Hoar, 1969).

Nos vertebrados os testículos são regulados por factores externos à gónada (Arukwe, 2001) e a reprodução é controlada por um sistema endócrino organizado hierarquicamente, dependente de uma interacção entre o cérebro, a pituitária e as gónadas (Sower *et al.*, 2009).

O hipotálamo situa-se na base do cérebro e é responsável pela libertação das hormonas libertadoras de gonadotrofinas (GnRH), que nos teleósteos, tal como em todos os vertebrados, actuam na pituitária. A pituitária ou hipófise encontra-se anexada ao hipotálamo e é muitas vezes referida como glândula mestre, por produzir uma variedade de hormonas que influenciam outras glândulas endócrinas (Neave, 2008). As GnRH estimulam a pituitária a produzir e libertar dois tipos de gonadotrofinas (GtHs), a hormona folículo-estimulante (FSH) e a hormona luteinizante (LH). No caso dos peixes são denominadas GtHI e GtHII, respectivamente, e são análogas à dos mamíferos (Weltzien *et al.*, 2004). Enquanto a GtHI está envolvida na gametogénese e esteroidogénese a GtHII está envolvida nos estádios finais de maturação da

gametogénese (Arukwe, 2001). As gonadotrofinas são libertadas na circulação e estimulam as gónadas ligando-se a receptores específicos nas membranas e regulando a gametogénese e esteroidogénese (Weltzien *et al.*, 2004). São em geral responsáveis pela estimulação da síntese de esteróides sexuais, que tal como referido são produzidos nas gónadas e actuam em tecidos alvo para regular a gametogénese, reprodução, fenótipo sexual, características comportamentais e também caracteres secundários (Arukwe, 2001; Neave, 2008).

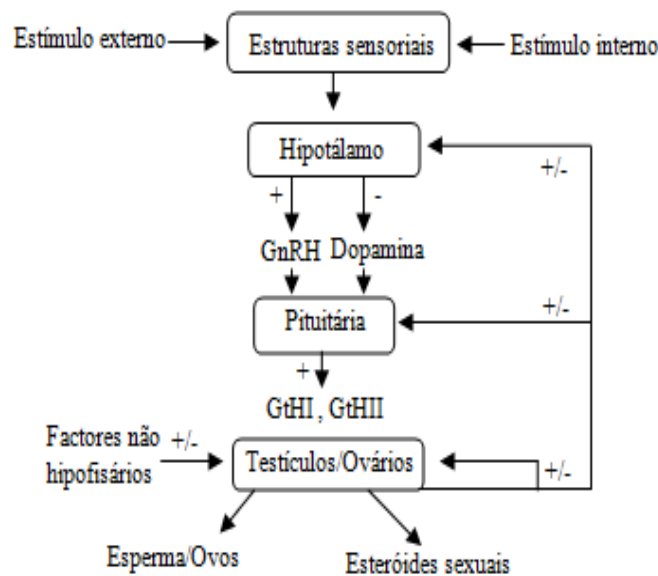


Figura 1.1 Esquema das vias de estimulação (+) e inibição (-) reprodutiva e maturação, consistindo em factores ou substâncias que regulam estruturas ou comportamentos em peixes teleósteos adultos. GnRH: hormona libertadora de gonadotrofinas; GtH: gonadotrofina I e II. Adaptado de Arukwe, 2001.

A regulação do eixo cérebro-pituitária-gónada e a produção de esteróides envolve um controlo complexo a múltiplos níveis, envolvendo diferentes vias de sinalização (Devlin & Nagahama, 2002). O complexo cálcio-calmodulina (Ca^{2+} -CaM) desempenha um importante papel na transmissão de sinal da GnRH para a LH (Haisenleder *et al.*, 2003).

A LH liga-se aos receptores através das proteínas G e induz a actividade da adenilato ciclase, uma enzima que produz AMP cíclico (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) a partir de ATP (Odell, 1989; Cooke, 1999). O cAMP exerce os seus efeitos nas células animais principalmente através da activação da enzima proteína quinase dependente de cAMP (quinase A ou PKA). O cAMP libertado no citoplasma liga-se a esta proteína (Alberts *et al.*, 1994; Sleight & Lieberman, 1997), originando uma

mudança conformacional que liberta a enzima activa (Alberts *et al.*, 1998; Manna *et al.*, 2009). Em algumas células a PKA catalisa a fosforilação de proteínas reguladoras de genes que activam a transcrição de genes seleccionados (fig.1.2) (Alberts *et al.*, 1998).

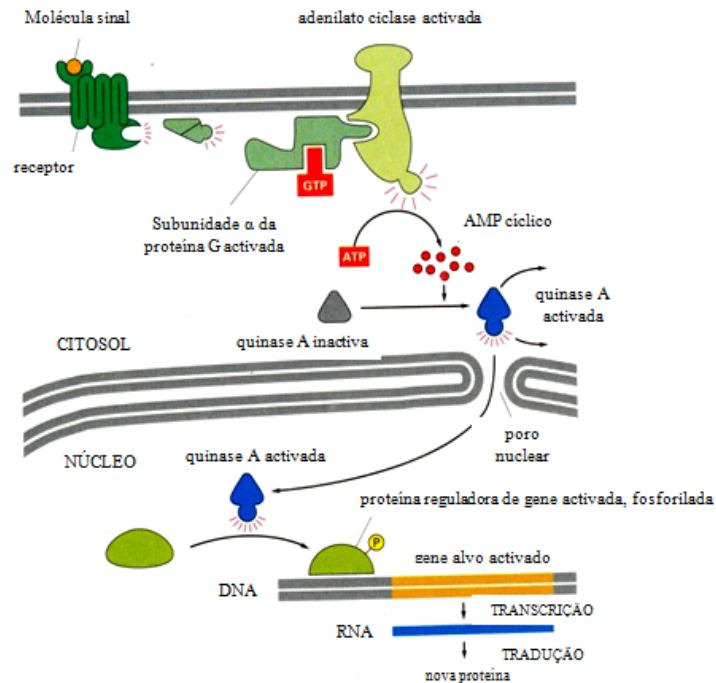


Figura 1.2: Activação da transcrição de gene por aumento do cAMP. A ligação da hormona ao receptor associado à proteína G, permite a activação da adenilato ciclase e aumento do cAMP que activa a quinase A no citosol. Após activação a proteína quinase A passa para o núcleo e catalisa a fosforilação da proteína reguladora do gene. Fonte: Adaptado de Alberts *et al.*, 1998.

A GnRH exerce a sua acção através de uma interacção complexa de vias de sinalização (fig.1.3). Por activação da fosfolipase C, são produzidos dois mensageiros secundários, o inositol trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol (DAG). O IP₃ liberta iões de cálcio (Ca²⁺) intracelular, resultando num aumento da concentração de cálcio citosólico (Valenti *et al.*, 1999). O cálcio é um dos cinco elementos mais abundante e vital para vida animal, estando envolvido num conjunto notável de funções reguladoras intracelulares (Means, 2000; Bentley, 1985). Deste modo o cálcio intracelular é um elemento chave nos mecanismos de regulação de secreção de hormonas, e necessário para uma estimulação máxima da esteroidogénese (Cooke, 1999). A maioria dos eventos nucleares que necessitam de cálcio é mediada pela ligação do cálcio à CaM (Means, 2000), uma proteína de ligação intracelular de cálcio (Kahl & Means, 2003). Quando o cálcio se liga à CaM altera a sua configuração e produz um complexo capaz de interagir com uma variedade de enzimas e de proteínas (Exton & Blackmore, 1989), como a adenilato ciclase (Potter, 1992; Alberts *et al.*, 1994) e as GtHs, ambas reguladas por este complexo Ca²⁺/CaM. A CaM é capaz de influenciar diversas vias de sinalização

intracelular, incluindo a activação da proteína quinase dependente de CaM (CaMK) (Condon *et al.*, 2002).

Um outro mensageiro secundário, o DAG, anteriormente referido, regula a actividade da proteína quinase C (PKC) (Valenti *et al.*, 1999). Esta proteína é um elemento chave na transdução de sinais e regulação celular (Burgess, 1992), e apesar de ser activada pelo DAG, também necessita de uma ligação ao cálcio, por isso é uma das vias de mediação da acção do cálcio intracelular, além da CaM (Dedman & Kaetzel, 1997). Apesar de ter os mesmos princípios de activação que a PKA, as suas proteínas alvo são diferentes (Alberts *et al.*, 1998) e estão associadas a diversos processos biológicos, entre os quais está envolvida na formação do sistema de reprodução masculino (Manna *et al.*, 2001).

A activação de todas as vias referidas nas gónadas tem como resultado um aumento na produção de esteróides sexuais.

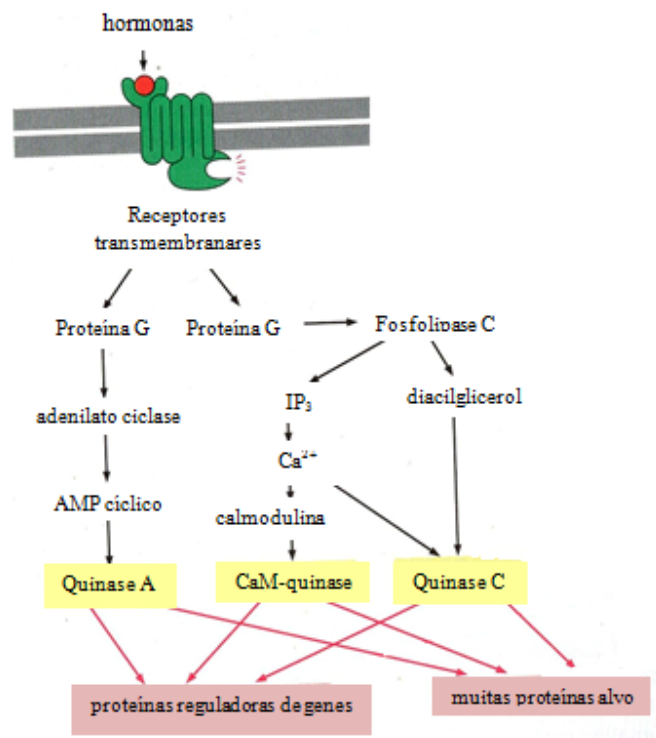


Figura 1.3: Vias de sinalização intracelulares. O diagrama representa as vias das proteínas G ligadas a receptores via cAMP. A vermelho a interconexão reguladora e a amarelo as quinases. Fonte: Adaptado de Alberts *et al.*, 1998.

Os esteróides sexuais têm não só um efeito directo no desenvolvimento das células germinativas, como também influenciam outros tipos de células e órgãos envolvidos na diferenciação sexual (Devlin & Nagahama, 2002). São sintetizados a

partir do colesterol por enzimas esteroidogénicas localizadas nas gónadas, em células esteroidogénicas, que nos machos inicialmente são as células de Leydig (Kime, 1987).

Existem três classes principais de esteróides, os estrogénios, que incluem o estradiol e a estrona, e são responsáveis pelas características sexuais secundárias e em vertebrados não mamíferos estão implicados na vitelogénese; as progesteronas, uma classe distinta da anterior, que nos peixes apesar de estar envolvida na maturação dos gâmetas, não tem relevância na diferenciação sexual; e os androgénios, nos quais está incluída a testosterona e 11-cetotestosterona (11-KT), responsáveis pelo comportamento sexual dos machos e características sexuais secundárias (Kime, 1987). Nos peixes a 11-KT induz o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e está também associada com territorialidade e com o comportamento de corte em machos maiores (Godwin, 2011).

As enzimas envolvidas na síntese de esteróides sexuais pertencem a duas grandes classes, a superfamília de enzimas citocromo P450 (CYP) e as hidroxisteróide desidrogenases (HSD) (Payne & Hales, 2004). O metabolismo destes esteróides é catalisado, em diferentes posições por diversas P450s, como a CYP11A (P450_{scc}) (Lewis, 1996). Esta enzima catalisa o primeiro passo enzimático na síntese dos esteróides, a conversão de colesterol em pregnenolona (Schulz *et al.*, 2001). A conversão da pregnenolona e posteriormente da androstenediona, é catalisada pela CYP17A (P450_{17 α}), formando-se a 17 α -hidroxiprogesterona, como um intermediário (Lewis, 1996; Payne & Hales, 2004). Por redução da androstenediona forma-se a testosterona, passo controlado pela 17 β -hidroxisteróide desidrogenase (17 β -HSD) (Labrie *et al.*, 1997; Metzler, 2003). No testículo, a testosterona é posteriormente convertida em 11 β -hidroxitesterona, por acção da enzima CYP11B₁. O último passo na síntese da 11- cetotestosterona (11-KT) é controlado pela 11 β -hidroxisteróide desidrogenase (11 β -HSD), que converte o androgénio 11 β -hidroxitesterona a 11- KT (Rasheeda *et al.*, 2010) (fig.1.4).

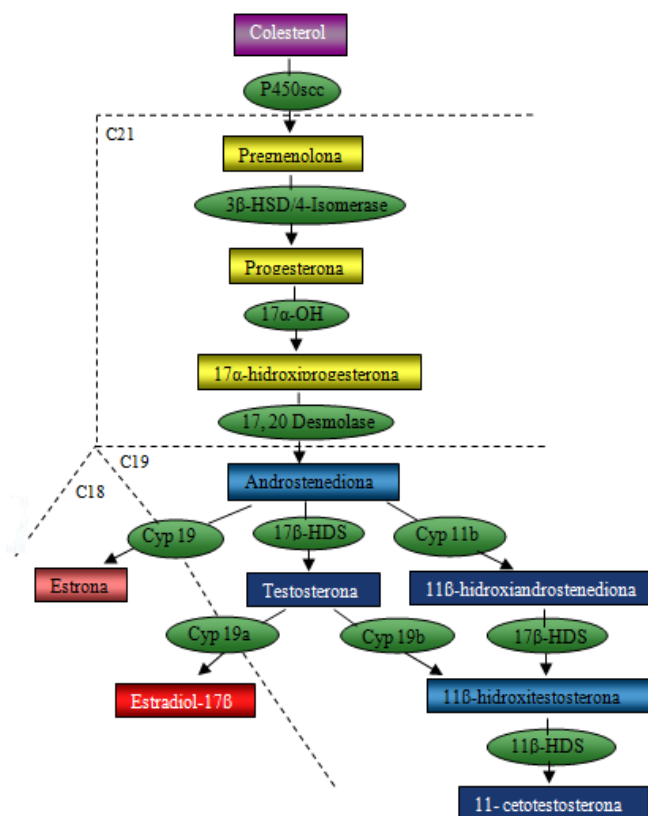


Figura 1.4. Via esteroidogénica desde colesterol até os principais esteróides sexuais envolvidos na diferenciação sexual da gónada. A verde as enzimas esteroidogénicas, a amarelo as progesteronas, a azul os androgénios e a vermelho os estrogénios. A azul-escuro e vermelho escuro os androgénios e estrogénios com maior potência relativa. Fonte: Adaptado de Piferrer, 2011.

A estimulação da produção de testosterona é feita pela ligação da LH aos receptores, que se encontram nas células de Leydig (Steinberger, 1989; Walker & Cheng, 2005). Os receptores têm duas funções, o reconhecimento da hormona e a transmissão desta ligação num sinal que provoca uma mudança no metabolismo celular (Kahn, 1989). As células de Sertoli possuem receptores para testosterona e FSH, responsável por regular as actividades destas células e pelo suporte do desenvolvimento das células germinativas, sendo por isso o principal alvo dos sinais hormonais que regulam a espermatogénese (Walker & Cheng, 2005; Schulz *et al.*, 2010).

As enzimas P450 são reguladas pelo factor esteroidogénico 1 (SF1), um receptor nuclear órfão (Payne & Hales, 2004) que tem um papel no desenvolvimento e função de múltiplos órgãos endócrinos essenciais à reprodução (Ingraham *et al.*, 1994). É expresso em diversos tecidos endócrinos, nos quais estão incluídos a pituitária, hipotálamo e gónadas, desempenhando um papel importante na função da gónada e esteroidogénese (Kojima *et al.*, 2006). Estudos revelaram uma função do SF1 no desenvolvimento de tecidos esteroidogénicos (Sadovsky *et al.*, 1995) e o envolvimento na regulação de genes envolvidos na síntese de hormonas esteróides (Parker & Schimmer, 1997), como

por exemplo na regulação da expressão da proteína de regulação aguda da esteroidogénese (StAR). Esta proteína desempenha um papel crítico na entrega do colesterol para a mitocôndria, onde são catalisadas as reacções iniciais da esteroidogénese (Sugawara *et al.*, 1996; Caron *et al.*, 1997).

A regulação da transcrição de genes alvo do SF1, parece ser em parte regulada pelos níveis intracelulares de SF1 e DAX1 (gene Dosagem-sensível de reversão sexual, hipoplasia Adrenal região crítica, no cromossoma X, gene 1), sendo a razão entres estes dois factores determinante para a activação ou repressão desses genes. Se estiver presente mais SF1 na célula do que DAX1, as moléculas de SF1 superam os complexos SF1/DAX1 e os genes alvo serão activados. O contrário acontece se existir mais DAX1, ocorrendo a repressão dos genes alvo (Iyer & McCabe, 2004).

O DAX1 é um membro da superfamília de receptores nucleares órfãos (Niakan & McCabe, 2005) e a sua expressão tecidual, nas glândulas adrenais, pituitária e gónadas é semelhante à do SF1 (Parker & Schimmer, 1997). Apesar da maioria dos receptores nucleares terem todos os domínios funcionais que caracterizam os receptores nucleares clássicos, o DAX1 não tem o domínio de ligação ao ADN característico dos restantes membros desta superfamília (Giguère, 1999). Tal como o SF1, o DAX1 também está envolvido na regulação das enzimas P450, contudo pode ter como função a supressão da aromatase P450, em ovários de peixe (Nakamoto *et al.*, 2007).

Objectivo

A rápida regulação dos níveis de androgénios, nomeadamente na tilápia (*Oreochromis mossambicus*) (Oliveira *et al.*, 1996) levou a uma necessidade de compreender a influência das diferentes vias de sinalização envolvidas neste processo.

Este trabalho teve como objectivo determinar o envolvimento da via PKC nos níveis basais de esteróides, nomeadamente testosterona e 11-KT, ou seja, se esta via era essencial para manter estes níveis. E, até que ponto, esta via era necessária para manter os níveis estimulados pela cAMP.

Um outro objectivo deste trabalho foi caracterizar a expressão dos genes que controlam a produção de esteróides da gónada, o SF1 e o DAX1.

Dado o envolvimento do SF1 na esteroidogénese (Achermann *et al.*, 2001), e da sua interacção com o DAX1 (Ito *et al.*, 1997), estes foram os genes escolhidos para analisar neste trabalho. A análise destes dois genes teve como objectivo verificar se a

sua expressão poderia, de algum modo, explicar o efeito das manipulações das vias na produção de esteróides.

2. Métodos

2.1 Manutenção dos animais

Seis tilápias (*Oreochromis mossambicus*) macho (média dos pesos = 77,98g; desvio padrão = 10,93), foram colocadas num tanque na Universidade do Algarve a aclimatar durante seis dias. Foram alimentadas todos os dias, até 24h antes de serem sacrificadas. Apesar das tilápias sobreviverem a condições do meio muito variadas, para se obter um crescimento óptimo, existem factores que é importante ter em conta. A temperatura da água deverá se encontrar entre os 25-32°C e o pH entre 6.5-9.0. Mesmo sendo animais de água doce, a sua tolerância a água salgada é elevada, podendo por isso permanecer em água doce e salgada. A alimentação pode ser bastante variada, pois em meio natural são animais omnívoros (Nandlal & Pickering, 2004; FAO, 2012).

2.2 Experiencias *in vitro*

Após aclimação, as tilápias foram anestesiadas com MS222 (tricaína metano sulfonato) (0.1g/l) e bicarbonato de sódio (0.2g/l) para controlar a acidez provocada pelo MS222 e rapidamente sacrificadas. Todas as tilápias foram pesadas e o tecido testicular de todos os peixes foi recolhido e colocado imediatamente em meio Cortland (pH 7.8) contendo 118.5mmol/l NaCl, 4.7mmol/l KCl, 1.5mmol/l CaCl₂, 1.5mmol/l MgSO₄, 1.2mmol/l NaH₂PO₄, 10mmol/l NaHCO₃, 2mmol/l Glucose e 15mM Hepes. O meio foi saturado com a mistura de O₂/CO₂ antes de se começar as incubações (10 min). As gónadas de cada peixe foram cortadas em fragmentos de tamanho idêntico e colocados em 60 poços de placas de plástico de cultura tecidular (fig. 2.1). Cada poço continha 1ml de meio Cortland com o respectivo tratamento. Os poços controlo continham apenas 1ml de meio Cortland.

As placas foram colocadas em sacos de plástico, o ar foi saturado com uma mistura de O₂ e CO₂ e incubados durante 8h a uma temperatura de cerca de 24°C.

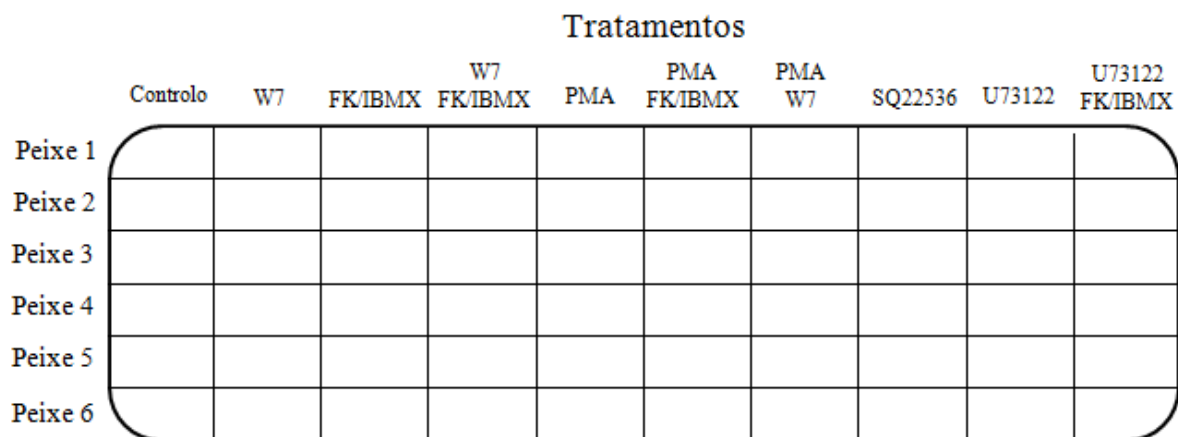


Figura 2.1. Esquema representativo da placa de cultura utilizada nas incubações *in vitro* e respectivos tratamentos. Cada poço continha 1ml de meio Cortland e o respectivo tratamento. W7 ([N-(6-aminohexyl)-5-cloro-1-naftaleno-sulfonamidas]); FK (forskolina); IBMX (3-isobutil-1-metilxantina); PMA (forbol 12-miristato 13-acetato); SQ22536 (9-(tetrahydro-2-furanyl)-9H-purina-6-amina); U73122 ([1-(6-((17β-3-methoxyestr-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)-hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione])). O controlo continha apenas 1ml de meio Cortland. O tempo de incubação para todos os tratamentos foi de 8h.

2.3 Efeito das vias na produção de androgénios

a) Efeito da cAMP-PKA na produção de androgénios

De modo a estudar o efeito da activação da via de cAMP-PKA, foi utilizada a FK (forskolina) (100mM), um activador da produção de cAMP e o IBMX que inibe a degradação do mesmo. Os fragmentos das gónadas dos seis peixes foram colocados num 1ml de meio Cortland contendo 10μM de FK e 500μM de IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) (500mM) (grupo FK/IBMX).

O efeito da inibição desta via na produção de esteróides foi estudado utilizando o inibidor da PKA, SQ22536 (9-(tetrahydro-2-furanyl)-9H-purina-6-amina) (50μM). Os fragmentos foram incubados num 1ml de meio Cortland com 100mM de SQ22536 (grupo SQ22536).

b) Efeito da PKC na produção de androgénios

Para estimular a PKC foi utilizado o PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) (10mM). Os fragmentos foram incubados em meio Cortland que continha 100mM de PMA (grupo PMA). O PMA é muito similar ao diacilglicerol, um dos activadores naturais da PKC e o U73122 actua inibindo a hidrólise do IP₃. Este é um inibidor que tem sido muito utilizado como inibidor da fosfolipase C (Walker *et al.*, 1998).

O estudo da inibição desta via na produção de esteróides foi feito incubando os fragmentos das gónadas num 1ml de meio Cortland com 10mM de U73122 [1-(6-((17 β -3-methoxyestr-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)-hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione)] (0,010mM), (grupo U73122).

c) Efeito da Ca²⁺-CaM na produção de androgénios

Para testar o efeito da inibição da CaM, foi utilizado um inibidor, W7 [N-(6-aminohexyl)-5-cloro-1-naftaleno-sulfonamidas)] (25mg/50 μ l dissolvido em DMSO). O tratamento continha 1ml de Cortland e 80 μ M de W7 (grupo W7). Foi também testado o efeito da activação da cAMP-PKA e inibição da CaM, incubando os fragmentos das gónadas em meio de Cortland com 10 μ M de FK, 500 μ M de IBMX e 80 μ M de W7 (grupo W7/FK/IBMX). Para testar o efeito da inibição da CaM e activação da via PKC, os fragmentos das gónadas foram incubados num em meio de Cortland com 100mM de PMA e 80 μ M de W7 (grupo PMA/W7).

d) Cruzamento de vias

Para estudar o cruzamento das vias PKA e PKC foram realizados dois tratamentos. Um tratamento em que as vias cAMP-PKA e PKC foram estimuladas em simultâneo. Os fragmentos dos peixes foram incubados num 1ml de meio Cortland contendo 10 μ M de FK, 500 μ M de IBMX e 100mM de PMA (grupo PMA/FK/IBMX). Um outro tratamento no qual a via PKA foi estimulada e a via PKC inibida. Os fragmentos foram incubados num 1ml de meio Cortland com 10 μ M de FK, 500 μ M de IBMX e 5,38mM de U73122 (grupo U73122/FK/IBMX).

Todos os tratamentos foram feitos durante 8h. Após o período de incubação os fragmentos foram recolhidos e guardados a -80°C e os meios foram recolhidos e guardados a -20°C para posteriormente serem processados e analisados.

2.4 Radioimunoensaios (RIA)

O método de radioimunoensaio é utilizado para analisar muitas substâncias biológicas que estão presentes em quantidades mínimas, incluindo os esteróides (Mathews e van Holde, 1990).

Os meios de incubação (50µl) foram desnaturados durante 1h a 70°C. A medição dos esteróides foi feita através de RIA, seguindo a metodologia descrita por Canário e Scott, (1989). A cada 100 µl de amostra foi adicionado o tampão gelatina com o marcador e o respectivo anticorpo. Os anticorpos utilizados foram o anti-testosterona (“Meret” cedido por A. P. Scott) e anti-11-KT (cedido por David Kime).

As tabelas específicas para os radioimunoensaios usadas neste estudo foram previamente publicadas para testosterona (T) (Kime & Manning, 1982) e 11-cetotestosterona (11-KT) (Scott *et al.*, 1984).

2.5 Extracção de RNA total

O RNA total dos tecidos de tilápia foi extraído utilizando o kit de purificação de RNA total (Promega) e o sistema automatizado de extracção Maxwell 16 (Promega).

Inicialmente adicionou-se 500µl de tampão de lise com β-mercaptoetanol (BME) (1,5ml de tampão de lise e 15µl de BME) por cada 50 mg de tecido. As amostras foram trituradas utilizando um homogeneizador de tecidos (Polytron). A vareta foi previamente lavada com RNase de modo a evitar a contaminação por RNase e entre cada um dos tratamentos foi lavada com água DEPC, com o mesmo objectivo.

Após um período de incubação de 10 min no gelo, adicionou-se 835µl de tampão de diluição azul e 125µl de “agente clarificante” (para remover DNA genómico) e foram colocadas durante 3 min a 70°C. Foi feito um vórtex a todas as amostras e incubadas durante 5 min a temperatura ambiente. A solução foi colocada em colunas e centrifugadas durante 2 min a 12000xg. A totalidade do fluído foi transferido para um novo tubo eppendorf.

Nas cuvetes foram colocados 300 µl de água estéril e as amostras foram colocadas no primeiro poço de cada cartucho. Os cartuchos foram colocados no Maxwell e procedeu-se à purificação do RNA. A totalidade da amostra foi retirada e transferida para um novo tubo eppendorf. As amostras foram armazenadas -80°C para serem posteriormente processadas.

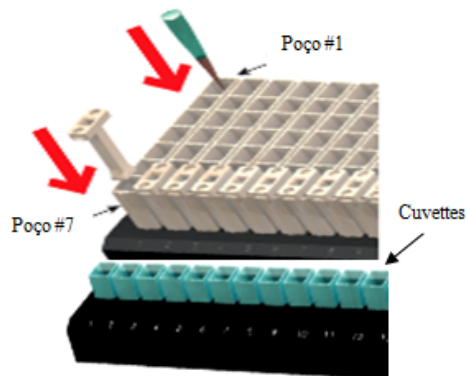


Figura 2.2. Esquema representativo dos cartuchos e cuvetes do kit da Promega, utilizados para extração de RNA na Maxwell. Cada poço continha: #1 tampão de lise ao qual foi adicionado a amostra, #2 Partículas paramagnéticas, #3 Solução A de lavagem de RNA, #4 Solução de lavagem, #5 Solução B de lavagem de RNA, #6 Solução B de lavagem de RNA, #7 Solução B de lavagem de RNA.

2.5.1 Análise quantitativa e qualitativa do RNA

A qualidade do RNA obtido foi analisada por electroforese em gel de agarose de 1% e foi quantificado no espectrofotómetro Nanodrop 1000. A quantidade de RNA é determinada medindo a absorvância a 260nm.

2.6 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a transcriptase reversa, uma enzima que sintetiza moléculas de DNA a partir de mRNA.

Foram utilizados 500 ng de RNA total em H₂O, para um volume final de 40µl. Adicionou-se 0,25µl de random hexamers (1µg/µl) a cada reacção. As amostras foram colocadas 5 min a 70°C para desnaturar e colocadas de imediato no gelo durante 5min.

Preparou-se a mistura de síntese, que por cada reacção continha: tampão 5x, 10mM de dNTPs, 0,5µl de MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) e 0,6µl de Inibidor (Ribolock RI). Adicionou-se 8,1µl da mistura ao RNA previamente desnaturado e incubou-se durante 1:30h a 37°C. As amostras foram guardadas a -20°C para serem posteriormente analisadas.

2.7 Reacção de polimerização em cadeia (PCR)

Esta é uma técnica de replicação enzimática cíclica de ácidos nucleicos, que permite a amplificação de sequências de DNA.

A expressão dos genes DAX-1 e SF-1 foi determinada através desta técnica com o cDNA previamente sintetizado, utilizando primers específicos para cada gene. Todas as reacções foram realizadas para um volume final de 25µl (contendo 1µl de cDNA e 24µl de mistura). A composição da mistura está descrita na tabela 1. Efectuou-se um PCR à subunidade ribossomal 18S (tabela 2.1) de modo a assegurar a qualidade do cDNA sintetizado, e posteriormente utilizado para linearizar variações na síntese de cDNA que levem a erros na quantificação. Os produtos de PCR obtidos foram analisados por electroforese em gel de agarose de 1% e corados com Brometo de etídeo (EtBr) (50µg/ml).

Posteriormente foi realizado um PCR aos dois genes referidos (tabela 1). Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose de 2%, corado com EtBr (50µg/ml). As electroforeses foram realizadas a 120 volts e os géis visualizados no Alpha Imager.

2.8 Quantificação

A quantificação foi feita com o Alpha Imager. Foi demarcado um rectangulo em redor de cada banda, com uma área idêntica entre as bandas. O programa de medição de densidade mede a intensidade da secção demarcada e atribui um valor. Posteriormente, a esse valor, foi subtraído o valor do “background”.

2.9 Estatística

As concentrações de esteróides e os níveis de expressão dos genes DAX1 e SF1 foram expressas como a média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados pela análise de variância com um factor (One-Way ANOVA) no programa SigmaPlot 11. Foi estabelecido um nível de significância de 5%.

Tabela 2.1. Composição da mistura de PCR e das condições de PCR para o 18S, DAX1 e SF1 utilizadas na experiência.

Mistura PCR				Condições PCR			
	18S	DAX1	SF1		18S	DAX1	SF1
Tampão 10x	2,5ul	2,5ul	2,5ul	Desnaturação	95°C-5min	95°C-5min	95°C-5min
dNTPs (10mM)	0,1ul	0,1ul	0,1ul	Hibridação	95°C-20segundos 58°C-20segundos 72°C-30segundos 24ciclos	95°C-15segundos 66°C-15segundos 72°C-15segundos 35ciclos	95°C-15segundos 60°C-15segundos 72°C-15segundos 35ciclos
Primers	0,1ul	0,5ul	0,5ul	Extensão	72°C-2min	72°C-2min	72°C-2min
Taq polimerase	0,1ul	0,1ul	0,1ul				
H ₂ O	21,1ul	20,8ul	20,8ul				

3. Resultados

Os resultados estão divididos em duas secções, uma onde são apresentados os resultados obtidos para a produção de esteróides (secção I), e uma outra secção onde são apresentados os resultados obtidos para a expressão dos genes SF1 e DAX1 (secção II).

Secção I Esteróides

3.1 Influência da via de cAMP-PKA no processo de esteroidogénese

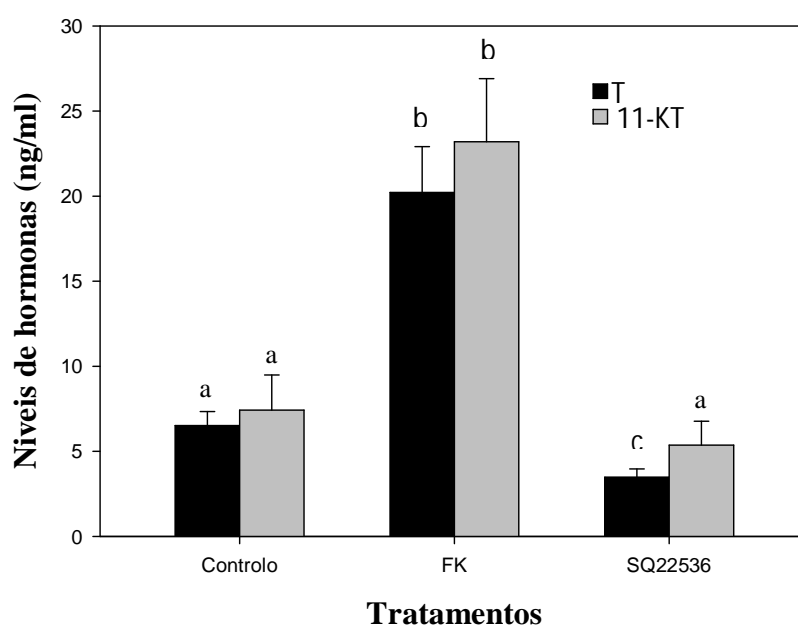


Figura 3.1. Efeito da forskolina e SQ22536 nos níveis de esteróides nos testículos. As diferentes letras denotam a diferença estatística ($p < 0,05$).

Os tecidos incubados com FK afectaram a produção de T e 11-KT, aumentando a sua produção de forma significativa ($p < 0,001$) e ($p = 0,002$), respectivamente. Nos tecidos incubados com SQ22536, apenas a diminuição da produção de testosterona foi significativa ($p = 0,01$) (Fig. 3.1).

3.2 Influência da via PKC no processo de esteroidogénese

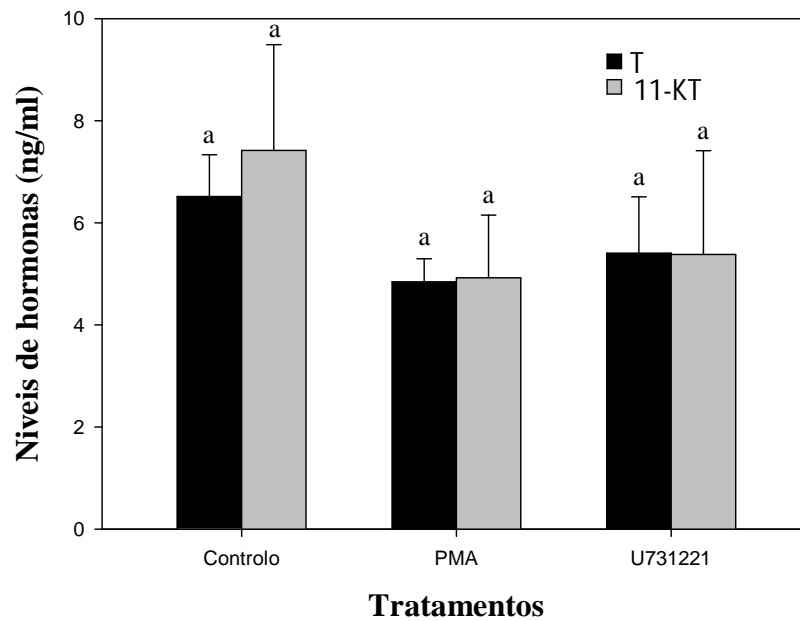


Figura 3.2. Efeito do PMA e U73122 nos níveis de esteróides nos testículos. Não existe diferença estatística entre os tratamentos e o controlo.

Os tecidos incubados com PMA e U73122 não afectaram de forma significativa a produção de T e 11-KT (Fig. 3.2).

3.3 Envolvimento de várias vias de sinalização em simultâneo no processo de esteroidogênese

a) Via cAMP-PKA e Ca^{2+} -CaM

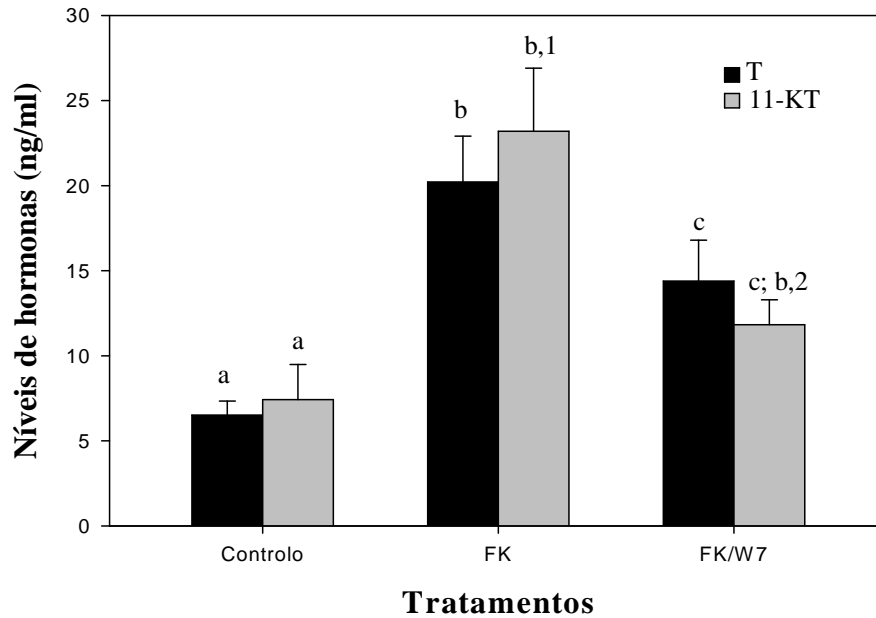


Figura 3.3. Efeito da forskolina e FK/W7 nos níveis de esteróides nos testículos. As diferentes letras e números denotam a diferença estatística ($p < 0,05$)

De modo a determinar o efeito da CaM na via de sinalização PKA, os tecidos foram tratados com FK/W7. Quando comparados com o controlo, a produção de ambos os esteróides aumenta, testosterona ($p = 0,011$) e 11-KT ($p = 0,021$). Se comparar os dois tratamentos entre si, as diferenças são apenas significativas para 11-KT ($p = 0,017$) (figura 3.3).

b) Via PKC e Ca^{2+} -CaM

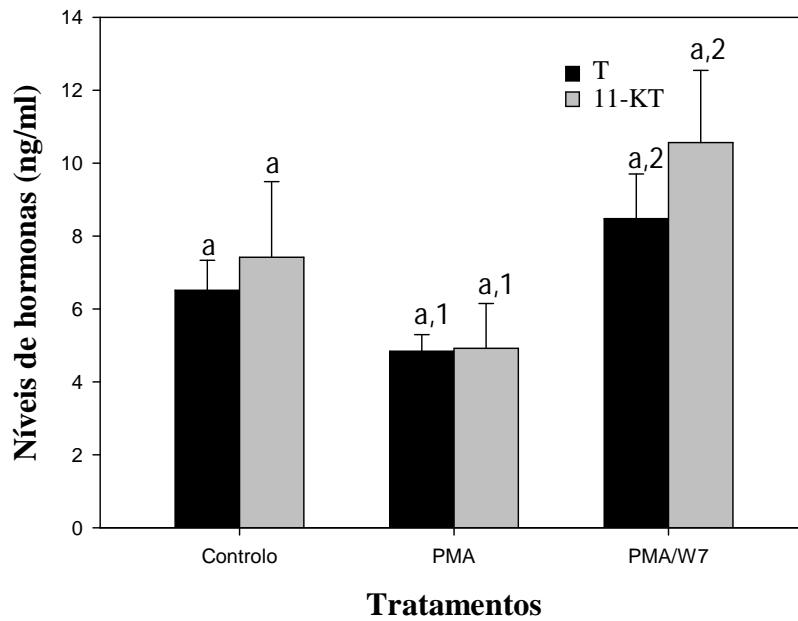


Figura 3.4. Efeito do PMA e PMA/W7 nos níveis de esteróides nos testículos. As diferentes letras e números denotam a diferença estatística ($p < 0,05$)

A influência da CaM na via PKC foi testada com o tratamento PMA/W7. Quando comparados os dois tratamentos verifica-se um aumento na produção de T significativo ($p = 0,020$), tal como na produção de 11-KT ($p = 0,036$) (Fig. 3.4).

c) Via cAMP-PKA e via PKC

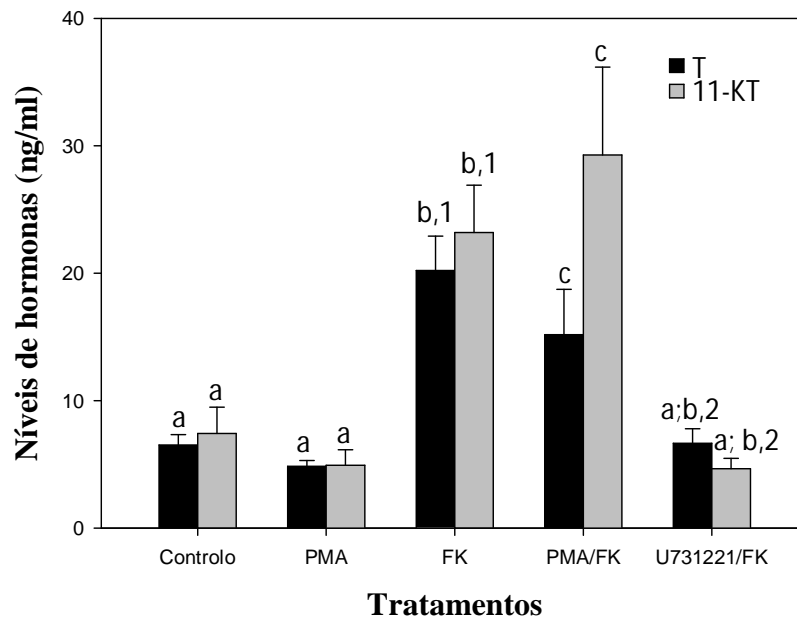


Figura 3.5. Efeito da forskolina, PMA, FK e U73122/FK nos níveis de esteróides nos testículos. As diferentes letras e números denotam a diferença estatística ($p < 0,05$)

A produção basal de esteróides não foi afectada de forma significativa com o tratamento U73122/FK, mas foi afectada quando os tecidos foram incubados com PMA/FK, T (0,015) e 11-KT (0,002). Quando comparamos o tratamento U73122/FK com os níveis estimulados com FK, a produção de ambos os esteróides diminui, T ($p < 0,001$) e 11-KT ($p < 0,001$) (fig. 3.5).

Secção II Expressão génica

3.4 Envolvimento de várias vias de sinalização na expressão dos genes SF1, DAX1 e 18S

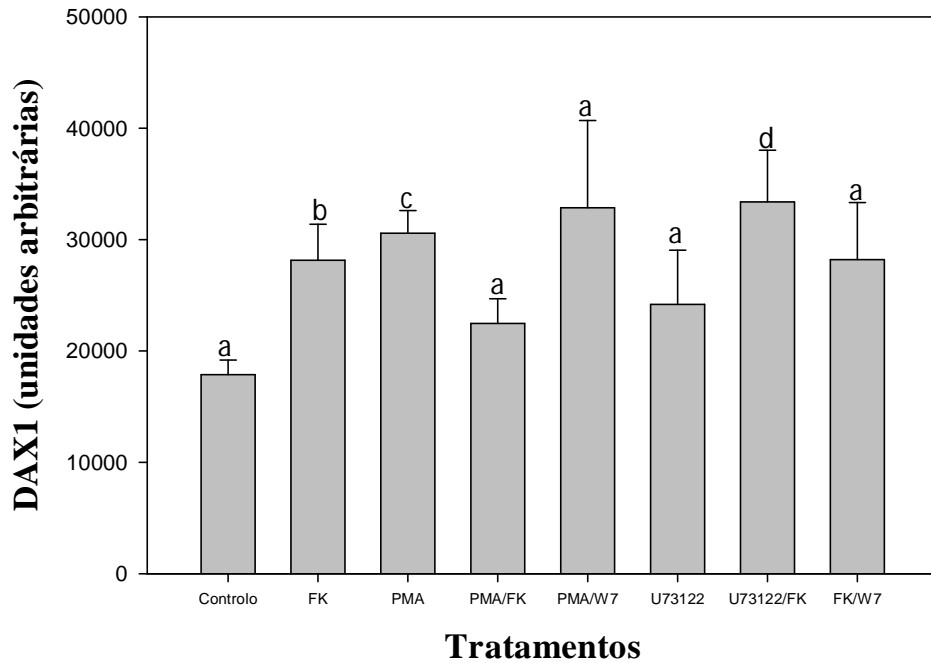


Figura 3.6. Efeito dos vários tratamentos na expressão do gene DAX1.

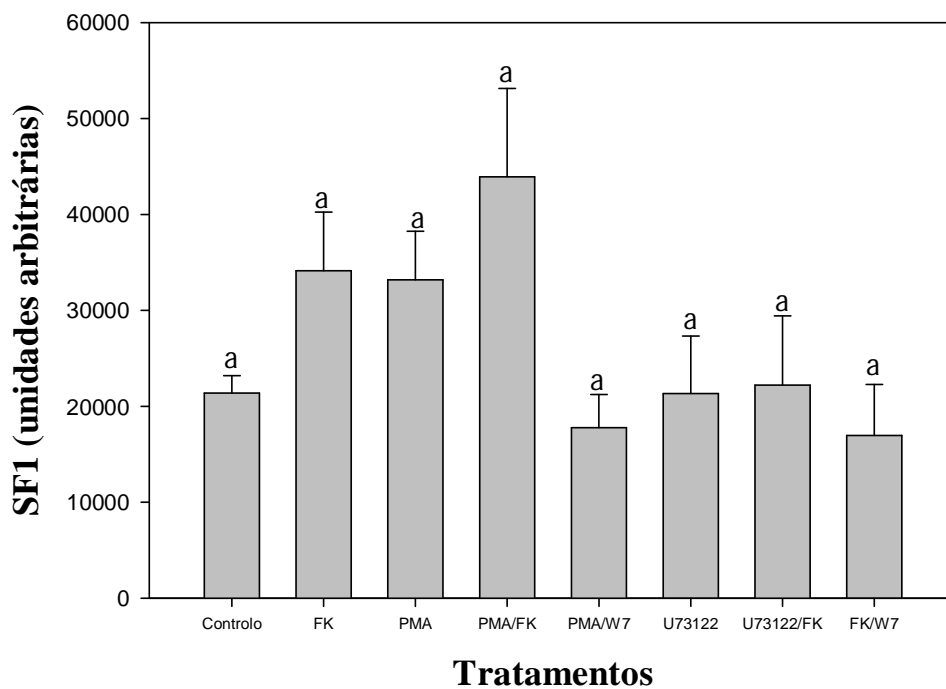


Figura 3.7. Efeito dos vários tratamentos na expressão do gene SF1.

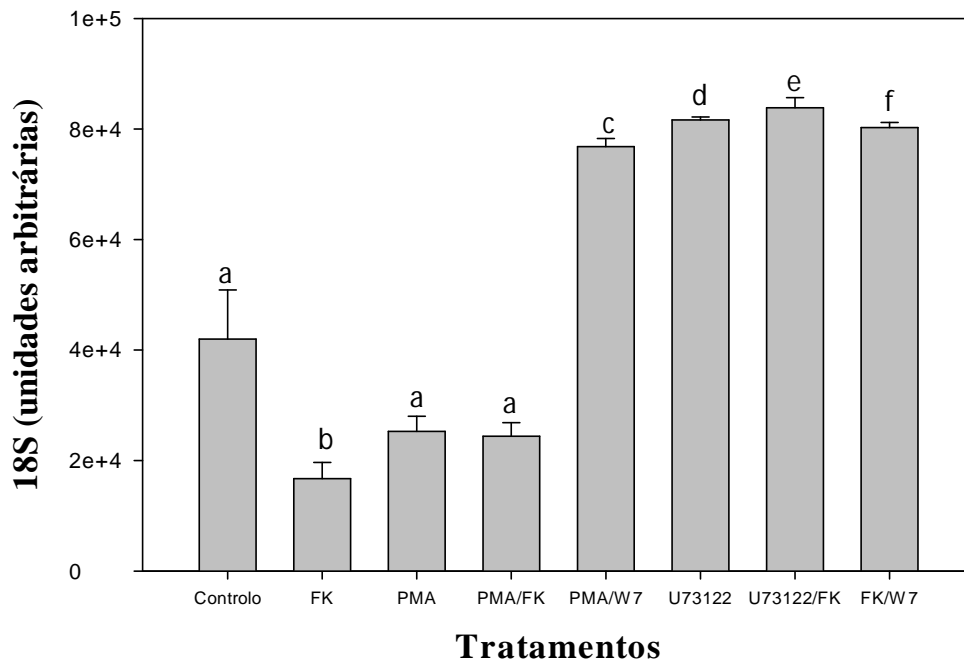


Figura 3.8. Efeito dos vários tratamentos na expressão do gene 18S. As diferentes letras denotam a diferença estatística ($p < 0,05$).

Quando comparado com o controlo, todos os tratamentos, com excepção dos tratamentos PMA e PMA/FK, afectaram de forma significativa a expressão do 18S, respectivamente FK ($p=0,022$), PMA/W7 ($p=0,003$), U73122 ($p=0,002$), U73122/FK ($p=0,002$) e FK/W7 ($p=0,002$).

Devido à variabilidade do 18S, e não existir tempo suficiente para testar outros genes de referência, não foi possível utilizá-lo como gene de referência neste trabalho. Deste modo, optamos por não interpretar os dados dos genes DAX1 e SF1, para não induzir em erro, visto que os resultados podem não estar correctos.

4. Discussão

Secção I Esteróides

Existem diversos estudos sobre a influência das vias de sinalização na produção de esteróides. Ao contrário de muitos deles, que têm como base níveis de esteróides estimulados por gonadotrofinas, no nosso estudo, estudámos o papel das vias de sinalização nos níveis basais de esteróides, a T e 11-KT.

Os níveis basais de testosterona e 11-KT obtidos no nosso estudo estão de acordo com outros estudos já realizados em ciclídeos (Huffman *et al.*, 2012; Ros *et al.*, 2003; Korzan *et al.*, 2008) e em peixe-dourado (*Carassius auratus*) (Lister *et al.*, 2008), o que nos permite confirmar as boas condições dos tecidos e do meio de incubação.

É indiscutível a importância do mensageiro cAMP na biossíntese de esteróides (Stocco *et al.*, 2005). Quando este mensageiro é estimulado, no caso do nosso estudo com forskolina, ocorre indução dos níveis basais de esteróides. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos anteriores em ciclídeos, com níveis estimulados com cAMP-PKA (Martins *et al.* 2009), mas também com níveis estimulados com GtH, tanto em tilápia (Aizen *et al.*, 2007), como na corvina do Atlântico (*Micropogonias undulatus*) (Benninghoff & Thomas, 2006). A cAMP-PKA é, presumivelmente, a principal via das gonadotrofinas (García-López *et al.*, 2009).

A inibição da via cAMP-PKA através do SQ22536 afectou os níveis basais de T, verificando-se uma diminuição, o que revela que pelo menos em parte, os níveis basais de T dependem desta via. Anteriormente tinha sido testado a inibição de CaM em simultâneo com a estimulação de cAMP-PKA (cAMP-PKA + W7) (Martins *et al.* 2009). O W7 é um agonista da CaM, que inibe os processos mediados pela CaM, prevenindo as interacções entre Ca^{2+} -CaM. Verificou-se, tal como no nosso estudo, que a redução não era total, o que sugere que a indução máxima de esteróides por cAMP estará também dependente de outras vias de sinalização

Uma das vias que tem sido sugerida como tendo um papel na síntese de esteróides é a via da PKC (Stocco *et al.*, 2005). Os resultados dos estudos realizados em relação à PKC são relativamente controversos. Alguns indicam um envolvimento desta proteína na activação da síntese de esteróides (Chaudhary & Stocco, 1988), outros indicam que não existe relação (Svechnikov *et al.*, 2001), e outros ainda indicam um

efeito negativo (Lopez-Ruiz *et al.*, 1992). O estudo realizado por Manna *et al.* (2007) demonstrou um envolvimento da via PKA e da via PKC na esteroidogénese. Para ter a certeza de que apenas a via PKC seria alterada, foram utilizados um estimulador e inibidor que actuam em passos específicos desta via.

Os níveis basais de T e 11-KT não se alteraram de forma significativa quando os tecidos foram incubados com PMA ou U73122. Estes resultados estão de acordo com outros estudos realizados, nomeadamente em peixe-dourado *Carassius auratus*, nos quais tratamentos com PMA não induziram qualquer alteração nos níveis de testosterona (Wade & Kraak, 1991; Srivastava & Kraak, 1994).

A via da PKC não está, aparentemente, envolvida na regulação dos níveis basais de esteróides. Contudo, poderá estar relacionada com a regulação dos níveis estimulados. Por este motivo, fomos testar a influência desta via em simultâneo com a via cAMP-PKA. Para tal, realizamos dois tratamentos. Um deles em que simultaneamente se estimulou a cAMP-PKA e a PKC (cAMP-PKA+PMA). Assim verificamos que a indução dos níveis de esteróides (fig. 3.5), pela forskolina não era alterada pela presença do PMA. Ou seja, o facto de estimular ambas as vias em simultâneo, não aumenta a indução em comparação com a estimulação apenas da via cAMP-PKA. Pelo contrário, quando a via PKC é inibida (U73122), não ocorre indução dos níveis de esteróides (fig. 3.5) pela forskolina, sugerindo que a activação da via cAMP-PKA é dependente da presença de PKC na célula. Estes dados vêm de encontro com a nossa hipótese inicial que tinha como um dos objectivos identificar a via de sinalização que permite que, na ausência de uma via de Ca^{2+} -CaM funcional, haja ainda uma estimulação significativa na produção de esteróides pela forskolina.

Em conclusão, os níveis basais de testosterona e 11-KT não dependem de PKC, mas estão dependentes de cAMP, pois bloqueando com SQ22536, a diminuição dos níveis de testosterona é significativa. A via cAMP-PKA, utilizada pelas GtHs, está parcialmente dependente da CaM, mas totalmente dependente da PKC, para a indução dos níveis dos androgénios, testosterona e 11-KT (fig. 4.1).

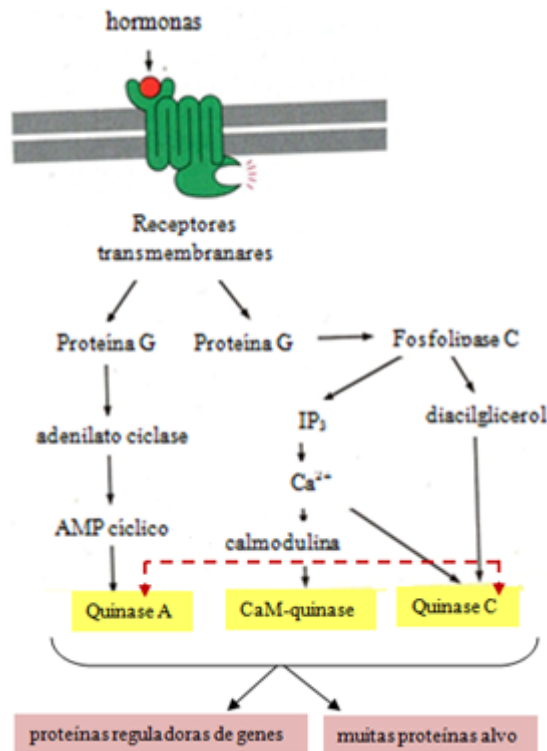


Figura 4.1. Esquema sugerido, em função dos resultados do presente trabalho, para as vias de sinalização intracelulares, complementando o esquema de Alberts *et al.*, 1998. O diagrama representa as vias das proteínas G ligadas a receptores. A cor-de-rosa a interconexão reguladora e a amarelo as quinases. A seta vermelha (tracejado) representa a relação entre as vias cAMP-PKA e PKC.

Secção II Expressão dos genes

A técnica utilizada neste trabalho foi o PCR semi-quantitativo, que usa um gene de referência que, tem que ter uma expressão constante em todas as amostras analisadas e cuja expressão não pode ser afectada pelos tratamentos (Radonić *et al.*, 2004). Para este estudo o gene de referência escolhido foi o 18S, um dos mais utilizados (Suzuki *et al.*, 2000; Zhu & Altmann, 2005), nomeadamente em trabalhos que envolviam o estudo do gene SF1 e DAX1, em peixes (Higa *et al.*, 2000; Choi, 2003; Rhee *et al.*, 2011; Vizziano-Cantonnet *et al.*, 2011), em ratos (Combes *et al.*, 2010) e também em células adrenais humanas (Suda *et al.*, 2011).

No entanto, verificámos que a expressão do 18S variava como os tratamentos. Uma das razões possíveis para esta variação pode ser a existência de diferenças no RNA tratado e sintetizado. Contudo tal não se verificou, pois foi realizada uma quantificação, antes e após o tratamento do RNA. Poderia ter ocorrido um erro técnico de pipetagem ou o cDNA reagir de forma diferente nos diversos tratamentos. Por este motivo consideramos que este gene não servia como gene de referência neste trabalho.

Assim sendo, os resultados obtidos neste trabalho não são reflexo do que está realmente a acontecer no tecido. Por este motivo, necessitam de ser repetidos, em trabalhos futuros, com outros genes de referência, por exemplo a β -actina, cathepsin D (*CTSD*), cathepsin Z (*CTSZ*), factor de alongamento 1 α (*EEF1A*) e proteína de ligação TATA (*TBP*) (Deloffre *et al.*, 2012).

Em estudos futuros será necessário repetir a análise da expressão dos genes SF1 e DAX1 mas utilizando outros genes de referência que não o 18 S, como por exemplo, os genes acima referidos.

5. Bibliografia

- Achermann, J. C., Meeks, J. J., Jameson, J. L. 2001. Phenotypic spectrum of mutations in DAX-1 and SF-1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **185**, 17-25.
- Aizen, J., Kasuto, H., Golan, M., Zakay, H. & Levavi-Sivan, B. 2007. Tilapia follicle-stimulating hormone (FSH): immunochemistry, stimulation by gonadotropin-releasing hormone, and effect of biologically active recombinant FSH on steroid secretion. *Biology of Reproduction*, **76**, 692-700.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. Comunicação celular – Capítulo 15. In: *Essencial Cell Biology. An Introduction to the Molecular Biology of the Cell*, pp. 1-629. New York: Garland Pub.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. 1997. Sinalização celular – Capítulo 15. In: *Biologia Molecular da Célula*. Terceira edição, pp. 1-1294. Porto Alegre: Artmed Editora.
- Arukwe, A. 2001. Cellular and molecular responses to endocrine-modulators and the impact on fish reproduction. *Marine Pollution Bulletin*, **42**, 643-655.
- Beeching, S. C. 1997. Functional groups in the social behavior of a cichlid fish, the Oscar, *Astronotus ocellatus*. *Behavioural Processes*, **39**, 85-93.
- Bekkevold, D., Hansen, M.W., Loeschcke, V. 2002. Male reproductive competition in spawning aggregations of cod (*Gadus morhua* L.). *Molecular Ecology*, **11**, 91-102.
- Benninghoff, A. D. & Thomas, P. 2006. Gonadotropin regulation of testosterone production by primary cultured theca and granulosa cells of Atlantic croaker: II. Involvement of a mitogen-activated protein kinase pathway. *General and Comparative Endocrinology*, **147**, 288-296.
- Bentley, P. J. 1982. Comparative vertebrate endocrinology. Segunda edição. 1-474. Cambridge University Press.
- Burgess, G. M. 1992. Analysis of Protein Kinase C Function. In: *Neuromethods 20 intracellular messengers* (Ed. by Boulton, A. A., Baker, G. B., Taylor, C. W.), pp. 1-565. New Jersey: Humana Press.
- Caron, K. M., Ikeda, Y., Soo, S-C., Stocco, D. M., Parker, K. L., Clark, B. J. 1997. Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *Molecular Endocrinology*, **11**, 138-147.
- Chaudhary, L. R. & Stocco, D. M. 1988. Stimulation of progesterone production by phorbol-12-myristate-13-acetate in MA-10 Leydig tumor cells. *Biochimie*, **70**, 1353-1360.

- Chen, W., Juan, L., Chung, B. 2005. SF-1 (Nuclear Receptor 5A1) Activity is activated by cyclic AMP via p300-mediated recruitment to active foci, acetylation, and increased DNA binding. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 10442-10453.
- Choi, C. 2003. Time-related effects of gonadotropin-releasing hormone and testosterone on steroidogenic factor-1 gene expression in Goldfish pituitary. *Korean Journal of Ichthyology*, **15**, 150-156.
- Combes, A. N., Spiller, C. M., Harley, V. R., Sinclair, A. H., Dunwoodie, S. L., Wilhelm, D. & Koopman P. 2010. Gonadal defects in Cited2 -mutant mice indicate a role for SF1 in both testis and ovary differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, **54**, 683-689.
- Condon, J. C., Pezzi, V., Drummond, B. M., Yin, S., Rainey, W. E. 2002. Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. *Endocrinology*, **143**, 3651-3657.
- Cooke, B. A. 1999. Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **151**, 25-35.
- Cruz, M. A. P. A. 2006. Ciclo hormonal reprodutor, clonagem e expressão da enzima P450 aromatase na Tilápia, *Oreochromis mossambicus* (Teleostei: Cichlidae). Tese de Doutorado, Universidade do Algarve.
- Dedman, J. R. & Kaetzel, M. A. 1997. Biophysical chemistry, metabolism, second messengers, and ultrastucture. Calcium as an intracellular second messenger: mediation by calcium binding proteins. In: *Cell Physiology Source Book* segunda edição (Ed. by Sperelakis, N.), pp. 1-1077. Academic Press.
- Deloffre, L. A. M., Andrade, A., Filipe, A. I. & Canario, A. V. M. 2012. Reference genes to quantify gene expression during oogenesis in a teleost fish. *Gene*, **506**, 69-75.
- Devlin, R. H. & Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, **208**, 191-364.
- Exton, J. P. & Blackmore, P. F. 1989. Principles of hormone action Volume 1 – Calcium-mediated hormonal responses. In: *Endocrinology* Volume 1 Segunda Edição (Ed. by DeGroot, L. J., Besser, G. M., Cahill Jr, G. F., Marshall, J. C., Nelson, D. H., Odell, W. D., Potts Jr, J. T., Rubenstein, A. H., Steinberger, E.), pp. 1-796. W.B Saunders Company
- Fan, W., Yanase, T., Wu, Y., Kawate, H., Saitoh, M., Oba, K., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Yanagisawa, J., Kato, S., Takayanagi, R. & Nawata, H. 2004. Protein kinase A potentiates adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor 1 transactivation by reintegrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, general control nonderepressed-5/transformation/ transcription domain-

- associated protein, and suppressor, dosage-sensitive sex reversal-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Molecular Endocrinology*, **18**(1), 127-141.
- FAO, Food and agriculture organization of the united nations. 2012. <http://www.fao.org/fishery/species/2408/en>
- Fessehaye, Y., El-bialy, Z., Rezk, M. A., Crooijmans, R., Bovenhuis, H. & Komen, H. 2006. Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: A microsatellite analysis. *Aquaculture*, **256**, 148-158.
- García-López, A., Bogerd, J., Granneman, J. C. M., Dijk, W., Trant, J. M., Taranger, G. L. & Schulz, R. W. 2009. Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African Catfish. *Endocrinology*, **150**, 357-365.
- Giguère, V. 1999. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocrine Reviews*, **20** (5), 689-725.
- Godwin, J. 2011. Behavior and physiology. – Social and reproductive behaviors. In: *Encyclopedia of Fish Physiology: from genome to environment* Volume 1 (Ed. by Farrell, A. P.), pp. 1-2091. Academic Press.
- Guerrero-Estévez, S. & Moreno-Mendoza, N. 2010. Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **20**, 101-121.
- Haisenleder, D. J., Ferris, H. A. & Shupnik, M. A. 2003. The calcium component of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone subunit gene transcription is mediated by calcium/calmodulin - dependent protein kinase type II. *Endocrinology*, **144**(6), 2409-2416.
- Higa, M., Kanda, H., Kitahashi, T., Ito, M., Shiba, T. & Ando, H. 2000. Quantitative Analysis of fushi tarazu Factor 1 Homolog Messenger Ribonucleic Acids in the Pituitary of Salmon at Different Prespawning Stages. *Biology of Reproduction*, **63**, 1756-1763.
- Hoar, W. S. 1969. Reproduction. In: *Fish Physiology, vol III. Reproduction and growth. Bioluminescence, Pigments, and poisons* (Ed. by Hoar, W. S. & Randall, D. J.), pp. 1-72. New York: Academic Press.
- Hofmann, H.A., Benson, M.E. & Fernald, R.D. 1999. Social status regulates growth rate: consequences for life-history strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 14171-14176.
- Huffman, L. S., Maggie, M. M., O'Connell, L. A. & Hofmann, H. A. 2012. Rising StARs: Behavioral, hormonal, and molecular responses to social challenge and opportunity. *Hormones and Behavior*, **61**, 631-641.
- Ingraham, H. A., Lala, D. S., Ikeda, Y., Luo, X., Shen, W-H., Nachtigal, M. W., Abbud, R., Nilson, J. H., Parker, K. L. 1994. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes & Development*, **8**, 2302-2312.

- Ito, M., Yu, R., Jameson, J. L. 1997. DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Molecular and Cellular Biology*, **17**, 1476-1483.
- Iyer, A. K. & McCabe, E. R. B. 2004. Molecular mechanisms of DAX1 action. *Molecular Genetics and Metabolism*, **83**, 60-73.
- Jalabert, B. & Zohar, Y. 1982. Reproductive physiology in cichlid fishes, with particular reference to tilapia and sarotherodon. In: *The Biology and Culture of Tilapias* (Ed. by Pullin, R. S. V. & Lowe-McConnell, R. H.), pp. 1- 426. Philippines.
- Kahl, C. R. & Means, A. R. 2003. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocrine Reviews*, **24(6)**, 719-736.
- Kahn, C. R. 1989. Principles of Hormone Action – Membrane receptors for peptide hormones. In: *Endocrinology Volume 1 Segunda Edição* (Ed. by DeGroot, L. J., Besser, G. M., Cahill Jr, G. F., Marshall, J. C., Nelson, D. H., Odell, W. D., Potts Jr, J. T., Rubenstein, A. H., Steinberger, E.), pp. 1-796. W.B Saunders Company.
- Kime, D. E. 1987. Structure of steroidogenic tissues and their modes of secretion I- The steroids. In: *Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology* (Ed. by Chester-Jones, I., Ingleton, P. M., Phillips, J. G.), pp. 1-661. Springer.
- Kime, D.E. and Manning, N.J. 1982. Seasonal patterns of free and conjugated androgens in the brown trout *Salmo trutta*. *General and Comparative Endocrinology*, **48**, 222-231.
- Kojima, Y., Sasaki, S., Hayashi, Y., Umemoto, Y., Morohashi, K., Kohri, K. 2006. Role of transcription factors Ad4BP/SF-1 and DAX-1 in steroidogenesis and spermatogenesis in human testicular development and idiopathic azoospermia. *International Journal of Urology*, **13**, 785-793.
- Korzan, W. J., Robison, R. R., Zhao, S. & Fernald, R. D. 2008. Color change as a potential behavioral strategy. *Hormones and Behavior*, **54**, 463-470.
- Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S., Claude, L., Simard, J., Breton, R., Bélanger, A. 1997. The key role of 17 β -hydroxysteroiddehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids*, **62**, 148-158.
- Lalli, E., Melner, M. H., Stocco, D. M., Sassone-Corsi, P. 1998. DAX-1 blocks steroid production at multiple levels. *Endocrinology*, **139**, 4237-4243.
- Lewis, D. F. V. 1996. Molecular modeling of mammalian cytochromes P450. In: *Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects* (Ed. by Ioannides, C.), pp 1-411. CRC Press
- Liley, N. R. & Stacey, N. E. 1983. Hormones, pheromones, and reproductive behavior in fish. In: *Fish Physiology Volume 9 Reproduction parte b Behavior and Fertility Control* (Ed. by Hoar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E. M.), pp. 1-469. New York: Academic Press.

- Lister, A., Nero, V., Farwell, A., Dixon, D. G., Van Der Kraak, G. 2008. Reproductive and stress hormone levels in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Aquatic Toxicology*, **87**, 170-177.
- Lopez-Ruiz, M.P., Choi, M.S., Rose, M.P., West, A. P. & Cooke, B.A. 1992. Direct effect of arachidonic acid on protein kinase C and LH-stimulated steroidogenesis in rat Leydig cells; evidence for tonic inhibitory control of steroidogenesis by protein kinase C. *Endocrinology*, **130**, 1122-1130.
- Manna, P. R., Huhtaniemi, I. T., Stocco, D. M. 2009. Mechanisms of protein kinase C signaling in the modulation of 3 β ,5 α -cyclic adenosine monophosphate-mediated steroidogenesis in mouse gonadal cells. *Endocrinology*, **150**(7), 3308-3317.
- Manna, P. R., Soh, J., Stocco, D. M. 2011. The involvement of specific PKC isoenzymes in phorbol ester-mediated regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression and steroid synthesis in mouse leydig cells. *Endocrinology*, **152**(1), 313–325.
- Martins, R. S. T., Fuentes, J., Almeida, O., Power, D. M, Canario, A. V. M. 2009. Ca²⁺-Calmodulin regulation of testicular androgen production in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *General and Comparative Endocrinology*, **162**, 153-159.
- Maruska, K. P. & Fernald, R. D. 2010. Behavioral and physiological plasticity: Rapid changes during social ascent in an African cichlid fish. *Hormones and Behavior*, **58**, 230-240.
- Mathews, C. K. & van Holde, K. E. 1990. Integration and control of metabolic processes. In: *Biochemistry* (Ed. by Mathews, C. K. & van Holde, K. E.), pp. 1-1129.
- Means, A. R. 2000. Signaling mechanisms mediated by ion channels, calcium, and lipids. In: *Principles of Molecular Regulation* (Ed. by Conn, P. M. & Means, A. M.), pp. 1-461. New Jersey: Humana Press.
- Metzler, D. E. 2003. Polyprenyl (isoprenoid) compounds. In: *Biochemistry The Chemical Reactions of Living Cells* (Ed. by Metzler, D. E.), pp 1-1973. Academic PR.
- Nakamoto, M., Wang, D., Suzuki, A., Matsuda M., Nagahama, Y. & Shibata, N. 2007. Dax1 suppresses P450arom expression in medaka ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development*, **74**, 1239-1246.
- Nandlal, S. & Pickering, T. 2004. Tilapia hatchery operation. Tilapia fish farming in Pacific Island countries. Volume 1. (Ed. by Nandlal, S. & Pickering, T.), pp.1-32. Noumea, New Caledonia: Secretariat of the Pacific Community.
- Neave, N. 2008. Hormones and the endocrine system. In: *Hormones and behaviour* (Ed. by Neave, N.), pp. 1-345. New York: Cambridge University Press.

- Niakan, K. K. & McCabe, E. R. B. 2005. DAX1 origin, function, and novel role. *Molecular Genetics and Metabolism*, **86**, 70-83.
- Odell, W. D. 1989. The male reproductive system - The Leydig Cell. In: *Endocrinology Volume 3 Segunda Edição* (Ed. by DeGroot, L. J., Besser, G. M., Cahill Jr, G. F., Marshall, J. C., Nelson, D. H., Odell, W. D., Potts Jr, J. T., Rubenstein, A. H., Steinberger, E.), pp. 1801-2769. W.B Saunders Company.
- Oliveira, R. F., Almada, V. C., Canario, A. V. M. 1996. Social modulation of sex steroid concentrations in the urine of male cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Hormones and Behavior*, **30**, 2-12.
- 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.
- Parikh, V. N., Clement, T. S., Fernald, R. D. 2006. Androgen level and male social status in the African cichlid, *Astatotilapia burtoni*. *Behavioural Brain Research*, **166**, 291-295.
- Parker, K. L. & Schimmer, B. P. 1997. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocrine Reviews*, **18**, 361-377.
- Payne, A. & Hales, D. B. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews*, **25**, 947-970.
- Potter, B. V. L. 1992. Synthetic analogs of intracellular messengers. In: *Neuromethods 20 Intracellular Messengers* (Ed. by Boulton, A. A., Baker, G. B., Taylor, C. W.), pp. 1-565. New Jersey: Humana Press.
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W. & Nitsche, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **313**, 856-862.
- Rasheeda, M. K., Kagawa, H., Kirubakaran, R., Dutta-Gupta, A., Senthilkumaran, B. 2010. Cloning, expression and enzyme activity analysis of testicular 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase during seasonal cycle and after hCG induction in air-breathing catfish *Clarias gariepinus*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **120**, 1-10.
- Rhee, J., Kim, B., Lee, C. J., Yoon, Y., Lee, Y., Lee, J. 2011. Bisphenol A modulates expression of sex differentiation genes in the self-fertilizing fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Aquatic Toxicology*, **104**, 218-229.
- Ros, A. F. H., Canario, A. M. V., Couto, E., Zeilstra, I. & Oliveira, R. F. 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.

- Sadovsky, Y., Crawford, P.A., Woodson, K.G., Polish, J.A., Clements, M.A., Tourtellotte, L.M., Simburger, K., Milbrandt, J. 1995. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 10939-10943.
- Schulz, R. W., Renato de França, L., Lareyre, J., LeGac, F., Garcia, H. C., Nobrega, R. H., Miura, T. 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, **165**, 390-411.
- 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 Part B*, **129**, 407-417.
- Scott, A. P., MacKenzie, D. S. & Stacey, N. E. 1984. Endocrine changes during natural spawning in the white sucker, *Catostomus commersoni*. II. Steroid hormones. *General and Comparative Endocrinology*, **56**, 349-359.
- Sleight, R. G. & Lieberman, M. A. 1997. Biophysical chemistry, metabolism, second messengers, and ultrastucture. Signal transduction. In: *Cell Physiology Source Book* segunda edição (Ed. by Sperelakis, N.), pp. 1-1077. Academic Press
- Sower, S. A., Freamat, M., Kavanaugh, S. I. 2009. The origins of the vertebrate hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) and hypothalamic–pituitary–thyroid (HPT) endocrine systems: New insights from lampreys. *General and Comparative Endocrinology*, **161**, 20-29.
- Srivastava, R. K. & Kraak, G. V. D. 1994. Effects of activators of different intracellular signaling pathways on steroid production by Goldfish vitellogenic ovarian follicles. *General and Comparative Endocrinology*, **93**, 181-191.
- St-Cyr, S. & Aubin-Horth, N. 2009. Integrative and genomics approaches to uncover the mechanistic bases of fish behavior and its diversity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, **152**, 9-21.
- Steinberger, E. 1989. The male reproductive system – structural consideration of the male reproductive system. In: *Endocrinology Volume 3 Segunda Edição* (Ed. by DeGroot, L. J., Besser, G. M., Cahill Jr, G. F., Marshall, J. C., Nelson, D. H., Odell, W. D., Potts Jr, J. T., Rubenstein, A. H., Steinberger, E.), pp. 1801-2769. W.B Saunders Company.
- Strüssmann, C. A. & Nakamura, M. 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, **26**, 13-29.
- Suda, N., Shibata, H., Kurihara, I., Ikeda, Y., Kobayashi, S., Yokota, K., Murai-Takeda, A., Nakagawa, K., Oya, M., Murai, M., Rainey, W. E., Saruta, T. & Itoh, H. 2011. Coactivation of SF-1-mediated transcription of steroidogenic enzymes by Ubc9 and PIAS1. *Endocrinology*, **152(6)**, 2266-2277.

- Sugawara, T., Holt, J. A., Kiriakidou, M., Strauss, J. F. 1996. Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry*, **35**, 9052-9059.
- Suzuki, T., Higgins, P. J. & Crawford, D. R. 2000. Control Selection for RNA Quantitation. *BioTechniques*, **29**, 332-337.
- Svechnikov, K. V., Sultana, T. & Soder, O. 2001. Age-dependent stimulation of Leydig cell steroidogenesis by interleukin-1 isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **182**, 193-201.
- Trewavas, E. 1983. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. pp 1-583. London: British Museum (Natural History), Ithaca, New York, Comstock Pub. Associates.
- Val, P., Lefrançois-Martinez A., Veyssi re, G., Martinez, A. 2003. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nuclear Receptor*, **1**:8.
- Valenti, S., Thellung, S., Florio, T., Giusti, M., Schettini, G., Giordano, G., 1999. A novel mechanism for the melatonin inhibition of testosterone secretion by rat Leydig cells: reduction of GnRH-induced increase in cytosolic Ca²⁺. *Journal of Molecular Endocrinology*, **23**, 299-306.
- Vizziano-Cantonnet, D., Anglade, I., Pellegrini, E., Gueguen, M., Fostier, A., Guiguen, Y. & Kah, O. 2011. Sexual dimorphism in the brain aromatase expression and activity, and in the central expression of other steroidogenic enzymes during the period of sex differentiation in monosex rainbow trout populations. *General and Comparative Endocrinology*, **170**, 346-355.
- Wade, M. G. & Kraak, G. V. D. 1991. The control of testicular androgen production in the goldfish: Effects of activators of different intracellular signalling pathways. *General and Comparative Endocrinology*, **83**, 337-344.
- Walker, E. M., Bispham, J. R. & Hill, S. J. 1998. Nonselective effects of the putative phospholipase C inhibitor, U73122, on adenosine A₁ receptor-mediated signal transduction events in Chinese hamster ovary cells. *Biochemical Pharmacology*, **56**, 1455-1462.
- Walker, W. H. & Cheng, J. 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, **130**, 15-28.
- 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.
- Weltzien, F., Andersson, E., Andersen,  ., Shalchian-Tabrizi, K., Norberg, B. 2004. The brain–pituitary–gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish

- (*Pleuronectiformes*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **137**, 447-477.
- White, S.A., Nguyen, T., Fernald, R.D. 2002. Social regulation of gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Experimental Biology*, **205**, 2567-2581.
- Zhang, P. & Mellon, S. H. 1997. Multiple orphan nuclear receptors converge to regulate rat P450c17 gene transcription: novel mechanisms for orphan nuclear receptor action. *Molecular Endocrinology*, **11**, 891-904.
- Zhu, L. & Altmann, S. W. 2005. mRNA and 18S-RNA coapplication–reverse transcription for quantitative gene expression analysis. *Analytical Biochemistry*, **345**, 102-109.
- Zwermann, O., Beuschlein, F., Lalli, E., Klink, A., Sassone-Corsi, P., Reincke, M. 2005. Clinical and molecular evidence for DAX-1 inhibition of steroidogenic factor-1-dependent ACTH receptor gene expression. *European Journal of Endocrinology*, **152**, 769-776.