

Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

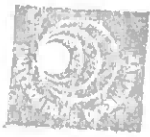
QUAL O PAPEL DA INTERRENAL NA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL INDUZIDA PELA TEMPERATURA NA TILÁPIA

Oreochromis mossambicus

MESTRADO EM AQUACULTURA

Maria de Lurdes Borges Diogo

Faro
2003



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

QUAL O PAPEL DA INTERRENAL NA DIFERENCIAÇÃO
SEXUAL INDUZIDA PELA TEMPERATURA NA TILÁPIA

Oreochromis mossambicus

MESTRADO EM AQUACULTURA

Maria de Lurdes Borges Diogo

Faro
2003

UNIVERSIDADE DO ALGARVE	
SERVIÇO DE DOCUMENTAÇÃO	
10.103.104	54228
639.37.5	
Bio*Qua	

3240T.

1

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Adelino Canário começo por agradecer a confiança que depositou em mim e a oportunidade que me proporcionou para concretizar este trabalho. Agradeço, ainda, todo o apoio prestado, extrema dedicação e empenho, disponibilidade, paciência, constante motivação e interesse demonstrado no decurso deste trabalho.

Ao Professor Adelino o meu muito obrigada também pela revisão e correcção da parte escrita que em muito contribuíram para a conclusão desta tese.

À Professora Doutora Deborah Power agradeço todo o apoio prestado ao longo deste trabalho.

À Rute Martins agradeço a amizade e companheirismo, bem como todos os ensinamentos transmitidos e as tantas vezes que me orientou no decorrer deste trabalho.

À Teresa Modesto agradeço a sua amizade, o apoio incondicional e a constante disponibilidade sempre demonstrada ao longo de todo período de realização deste trabalho. A ela agradeço também tudo o que me ensinou e a ajuda prestada em todos os momentos.

À Elsa Couto agradeço a sua constante prontidão e disponibilidade presentes em todos os momentos. Agradeço ainda os seus ensinamentos, a paciência e todo o apoio prestado na execução dos meus trabalhos de bancada.

À Natália Moura agradeço a sua boa amizade, todo o apoio e ajuda prestada assim como a sua permanente disponibilidade.

Ao João Condeça agradeço todo o apoio e ajuda no decurso deste trabalho.

Agradeço também a todos os colegas do Laboratório de Endocrinologia Molecular e Comparada da Universidade do Algarve, pelo bom ambiente de trabalho proporcionado e pela ajuda que sempre me disponibilizaram.

RESUMO

A tilápia de Moçambique, *Oreochromis mossambicus*, é uma espécie gonocorista, em que o sexo é determinado geneticamente e influenciado pela temperatura ou por interações entre a temperatura e o genótipo. O objectivo geral deste estudo foi testar a hipótese de que a masculinização como resultado do desenvolvimento embrionário a temperaturas elevadas resulta da contribuição de androgénios provenientes da interrenal.

A análise histológica das gónadas de larvas incubadas a 36°C indicou uma maior percentagem de masculinização do que as incubadas a 26°C. A acção da dexametasona, um glucocorticoide sintético, na diferenciação sexual não foi conclusivo devido à mortalidade selectiva verificada a altas temperaturas. Para investigar o perfil de androgénios e estrogénios, durante o desenvolvimento e diferenciação sexual a diferentes temperaturas foram incubadas larvas a 26°C e a 36°C. Não se observou um efeito significativo da temperatura ou da idade dos peixes nos níveis de 11-cetotestosterona e de 17 β -estradiol, assim como na razão entre os níveis das duas hormonas. A produção dos androgénios, testosterona e 11-cetotestosterona, pela interrenal *in vitro* foram inferiores aos de cortisol, na ausência de hormona corticotrófica, verificando-se, no entanto, que a produção basal de 11-cetotestosterona foi significativamente superior a 36°C. No meio de incubação de interrenal com precursor radioactivo foram detectados androgénios e progestagénios. O metabolismo total de 17-hidroxiprogesterona foi maior a 26°C, o que parece resultar num aumento de esteróides 5 α - e 5 β - reduzidos.

Em conclusão, confirmou-se que a temperatura elevada promove a masculinização das gónadas da tilápia de Moçambique, mas a hipótese de a interrenal ser mediadora deste processo, através da produção de um excesso de androgénios, não parece confirmar-se.

Palavras-chave: tilápia, dexametasona, corticosteróides, androgénios, diferenciação sexual, temperatura

WHAT IS THE ROLE OF THE INTERRENAL IN TILÁPIA *OREOCHROMIS* *MOSSAMBICUS* SEX DIFFERENTIATION INDUCED BY TEMPERATURE

Abstract

The Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*, is a gonochoric fish species in which sex is genetically determined and is influenced by temperature. The objective of this study was to test the hypothesis that masculinization as a result of embryonic development at high temperature is a result of the contribution of androgens from the interrenal.

The histological analysis of the gonads from larvae incubated at 36°C indicated a higher percentage of masculinization than those incubated at 26°C. No definite conclusions can be drawn about the effect of dexamethasone, a synthetic glucocorticoid, on sex differentiation owing to the selective mortality at high temperatures. To investigate the estrogen and androgen profile during development and sex differentiation at different temperatures larvae were incubated at 26°C and 36°C. There were no significant effects of temperature or fish age on the levels of 11-ketotestosterone and 17β-estradiol, as well as in the ratios of the two hormones. The production of the androgens, testosterone and 11-ketotestosterone, *in vitro* by the interrenal were lower than that of cortisol, in the absence of adrenocorticotrophic hormone. However, the basal production of 11-ketotestosterone was significantly higher at 36°C. Using radioactive precursors, androgens and progestagens were detected in media of interrenal incubates. The metabolism of 17-hidroxiprogesterona was higher at 26°C and seems to be a result of an increase in 5α- e 5β-reduced steroids.

In conclusion, we confirmed that high temperatures promote masculinization of Mozambique tilapia gonads, but the hypothesis that the interrenal mediates this process, through an excess of androgen production does not seem hold.

keywords: tilapia, dexamethasone, corticosteroids, androgens, sex differentiation, temperature

Documento provisório

ÍNDICE

RESUMO

I – INTRODUÇÃO	1
1. A problemática da diferenciação sexual	1
1.1. Determinismo e diferenciação do sexo	1
1.2. A glândula interrenal	8
1.3. Esteroidogénese	9
1.4. Corticosteroidogénese	10
1.5. Os esteróides sexuais e a diferenciação do sexo	12
1.6. O cortisol e a diferenciação sexual	14
1.7. Efeito da dexametasona na esteroidogénese	17
2. A biologia de <i>Oreochromis mossambicus</i>	17
3. Objectivos do presente trabalho	21
II - MATERIAL E MÉTODOS	22
III- RESULTADOS	29
1. Perfil de androgénios e estrogénios durante o desenvolvimento e a diferenciação sexual a 26°C e a 36°C	29
2. Efeito da temperatura e da dexametasona na diferenciação sexual	31
3. Efeito da ACTH e da temperatura na produção de androgénios e de cortisol <i>in vitro</i> pela interrenal	36
4. Efeito da temperatura na esteroidogénese da interrenal usando precursores radioactivos	40
IV – DISCUSSÃO	42
REFERÊNCIAS	52

I – INTRODUÇÃO

1. A Problemática da diferenciação sexual

1.1. Determinismo e diferenciação do sexo

Os peixes representam um grupo extremamente heterogéneo, não só na diversidade da sua sexualidade, mas também nos mecanismos genéticos do determinismo do sexo. A existência de diferentes mecanismos de diferenciação sexual entre espécies é uma característica comum, o que sugere duas possibilidades: uma delas considera que os vários mecanismos evoluíram independentemente, e a outra de que alguns mecanismos são adaptativos.

Nos mamíferos, o determinismo do sexo é estabelecido no momento da fecundação (sexo genético) e determina o sexo da gónada. Quando as gónadas completam a diferenciação, o sexo da gónada (sexo genotípico) dita o sexo fenotípico (Nagai, 1992).

Nos mamíferos foram identificados numerosos genes com funções no desenvolvimento sexual da gónada. Assim, são necessários dois genes para a formação dos primórdios da gónada (gónada indiferenciada), genes estes que são: o factor esteroidogénico 1 (*SFI*) e o tumor de Wilms (*WT1*) (Pieau et al., 1999).

O gene *SRY* determina a diferenciação dos testículos (a expressão de *SRY* nas futuras células de Sertoli da gónada). Dois outros genes – gene *SOX9* e gene *AMH* (hormona anti-Mülleriana) – estão também associados com a diferenciação das células de Sertoli. Estas células, provavelmente, orientam a diferenciação de outras células da gónada e, assim, a secreção da hormona anti-Mülleriana é acompanhada pela produção de androgénios nas células de Leydig (Wallace et al., 1999). A diferenciação dos ovários, normalmente ocorre na ausência do gene *SRY* e requer a presença do gene *DAX1* e de células germinais antes da produção de estrogénio pelas células da teca do folículo ovário (Wallace et al., 1999).

Nos mamíferos foi demonstrado que *SFI* pode activar a transcrição de enzimas esteroidogénicas, incluindo a activação do gene da aromatase. Contudo, *SFI* também está envolvido na activação da expressão dos genes *SOX9* e *AMH* (ambos específicos para a diferenciação dos testículos) e da sua transcrição quando o gene *WT1* interage com o gene *SFI*. Por outro lado, foi demonstrado que, o factor determinante dos testículos (*SRY*) e a hormona anti-Mülleriana estão envolvidos na repressão da transcrição do gene da aromatase (Haqq et al., 1993). Neste contexto, *DAX1*, interagindo com *SFI*, pode impedir a acção sinérgica de *WT1* e *SFI* e actuar como um repressor da transcrição dos genes *SOX9* e *AMH*. Assim, por repressão da via de expressão masculinizante, *DAX1* pode actuar como um factor feminizante (Pieau et al., 1999).

Para os numerosos genes envolvidos no determinismo do sexo da gónada (GSD) nos mamíferos foram já identificados genes homólogos com funções semelhantes nos vertebrados inferiores (peixes, répteis, aves e anfíbios), com excepção para o gene *SRY* (Scherer, 1999).

Os peixes, répteis e anfíbios exibem diferentes mecanismos do determinismo do sexo. Em geral, nos vertebrados, consideram-se dois mecanismos do determinismo do sexo: determinismo do sexo genotípico (GSD; sistemas XX/XY ou ZZ/ZW) e o determinismo do sexo dependente da temperatura (TSD) (Bull, 1980). Contudo, os cromossomas sexuais ou são heteromórficos, como nos mamíferos e aves, ou são homomórficos, somente identificados por análises genéticas como é o caso do atherinídeo, *Menidia menidia*, em que não foram identificados cromossomas sexuais, e no qual a percentagem dos sexos é influenciada pela temperatura (Conover e Kynard, 1981; Conover e Heins, 1987 a,b). Os sistemas heterogaméticos XX/XY e ZZ/ZW podem ser encontrados na mesma ordem, no mesmo género e até na mesma espécie

(Gordon, 1974; Hickling, 1960; Kallman, 1984). É o caso de *Xiphophorus* e algumas espécies hermafroditas (Scherer, 1999).

Nos peixes, os mecanismos básicos do determinismo do sexo são ainda pouco conhecidos. Contudo, é normalmente aceite que, a diferenciação sexual é ultimamente controlada por genes específicos do determinismo do sexo mas, em contraste com outros taxa, o desenvolvimento sexual nos peixes é prolongado e muito vulnerável. O sexo genotípico e o sexo fenotípico não coincidem necessariamente e, em muitas espécies, interações entre o genoma e factores internos e/ou externos podem influenciar e/ou determinar o sexo da gónada (Shapiro, 1988; Redding e Patino, 1993; Pieau et al., 1994) e podem mesmo levar a uma completa inversão do sexo.

Nos peixes, é de salientar que, a cronologia da diferenciação sexual da gónada é altamente variável. Assim, consideram-se espécies gonocoristas e espécies hermafroditas, podendo estas apresentar hermafroditismo síncrono ou hermafroditismo assíncrono (protândrico e protogíneo) (Atz, 1964; Yamamoto, 1969; Reinboth, 1970).

Tal como nos mamíferos, todos os outros vertebrados passam por um estágio neutro do sexo durante o desenvolvimento embrionário. Antes da diferenciação sexual, os ovários e testículos não são morfologicamente distintos, sendo designados por gónadas indiferenciadas ou bipotenciais. Estas gónadas bipotenciais são originadas a partir da região urogenital, região esta que vai contribuir para a formação do córtex adrenal (homóloga da interrenal ou cabeça do rim nos peixes), gónadas e rim.

Nos peixes, a diferenciação da gónada ocorre durante um período restrito do desenvolvimento. Contudo, este período difere muito de espécie para espécie e, por vezes, dentro da mesma espécie também se verificam alterações resultantes da influência de factores ambientais. Assim, podem considerar-se diferentes padrões da diferenciação sexual da gónada, podendo esta ocorrer alguns dias após a eclosão. Por

exemplo, no peixe gato (*Ictalurus punctatus*) ocorre aos 19 dias após a fertilização; em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), ocorre aos 20 dias após a eclosão; no salmão (*Oncorhynchus kisutch*) ocorre aos 30 dias após a eclosão; em *Apistogramma trifasciata* ocorre aos 30-40 dias após a eclosão; na truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*) ocorre aos 40 dias após a eclosão; em *Menidia menidia* ocorre aos 50 dias após a eclosão. Noutras espécies a diferenciação da gónada pode ocorrer só depois de alguns meses após a eclosão: na carpa comum (*Cyprinus carpio*) ocorre dos 2-4 meses e no robalo (*Dicentrarchus labrax*) ocorre dos 7-12 meses. Contudo, em algumas espécies, não é possível considerar uma escala de tempo para a diferenciação da gónada, tendo sido demonstrado, a existência de uma relação entre o período em que ocorre a diferenciação do sexo e o comprimento do corpo. Assim, no aterinídeo *Odontesthes bonariensis* as gónadas distinguem-se histologicamente aos 11-18 mm de comprimento, e em *Dicentrarchus labrax*, foi considerado aos 9 meses e 11,5 cm para as fêmeas, mas os machos só são histologicamente identificados aos 11 meses e 12,8 cm. É geralmente aceite que, nos peixes a diferenciação sexual das fêmeas precede a diferenciação sexual dos machos (Nakamura, 1978).

Em espécies gonocoristas e hermafroditas a diferenciação do sexo pode ser influenciada por factores ambientais, tais como temperatura, factores sociais, pH, densidade e hormonas sexuais:

- Densidade – geralmente altas densidades de cultivo induzem o desenvolvimento de machos, como foi demonstrado em *Anguilla anguilla* (Degani e Kushrinov, 1992), embora um efeito oposto tenha sido descrito em *Gasterosteus aculeatus* (Lindsey, 1962);
- Factores sociais – verifica-se em grupos com hierarquias, nos quais a remoção da fêmea dominante de uma colónia de espécies protogíneas induz a inversão do sexo do

macho de maior tamanho para fêmea, enquanto que em espécies protândricas, a remoção do macho dominante orienta a inversão do sexo na fêmea de maior tamanho (Shapiro, 1990, 1994);

- pH – o pH ácido da água de cultivo aumenta a proporção de machos, como descrito para os géneros *Apistograma*, *Pelviachromis* e *Xiphophorus* (Rubin, 1985);

- Temperatura – os efeitos produzidos variam de espécie para espécie. Assim, a temperatura pode influenciar um aumento na proporção de machos quando mantidos a baixas temperaturas, como demonstrado em *Anguilla anguilla* (D’Ancona, 1959), *Gasterosteus aculeatus* (Lindsey, 1962) *Rivulus marmoratus* (Harrigton, 1967) *Blicca bjoerkna* (Volodin e Grechanov, 1985) e *Oreochromis mossambicus* (Mair et al., 1990; Varadaj et al., 1994). Contudo, noutras espécies de peixes verifica-se o oposto, tal como em *Menidia menidia*, em que baixas temperaturas induzem a diferenciação do sexo para fêmeas (Conover e Kynard, 1981; Conover, 1984; Conover e Heins, 1987). Neste contexto, alguns factores ambientais podem influenciar drasticamente a diferenciação do sexo em espécies gonocoristas e a inversão do sexo em espécies hermafroditas. Nas espécies gonocoristas o mais importante factor ambiental determinante do sexo é a temperatura, mas é também o factor mais estudado (Strüssman e Patiño, 1995), enquanto que nas espécies hermafroditas são os factores sociais. No entanto, em ambos os grupos de espécies foram sugeridas interacções entre os factores ambientais e o genótipo.

Foram também demonstradas interacções entre o genótipo e a temperatura na manifestação do sexo fenotípico em várias espécies de vertebrados, incluindo no robalo, *Dicentrarchus labrax* (Conover e Heins, 1987; Lagormasino e Conover, 1993); em *Poeciliopsis lucida* (Sullivan e Schulz, 1986); no peixe gato *Ictalurus punctatus* (Patino et al., 1996), em *Odontheistes argentinensis* (Strüssmann et al., 1996a, 1996b) e em

Odonthestes bonariensis (Strüssmann et al., 1996b). Em tilápia do Nilo o sexo é determinado por factores genéticos (GSD), pela temperatura (TSD) e por interações entre a temperatura e o genótipo (Baroiller et al., 1995,2001), tal como sugerido em *Menidia menidia* (Conover e Kynard, 1981). Em tilápia do Nilo altas temperaturas (36°C) são masculinizantes quando comparadas com a temperatura controlo de 27-28°C (que é geralmente considerada a temperatura óptima para esta espécie), quando aplicadas durante o período termossensível da diferenciação do sexo da gónada (Baroiller et al., 1995).

Em diferentes espécies de peixes, foi demonstrado que a temperatura influencia a diferenciação do sexo, mesmo que exibam cromossomas sexuais distintos e para os quais o mecanismo genético de diferenciação do sexo tenha sido descrito, incluindo o salmão, *Oncorhynchus nerka* (Craig et al., 1996) e peixe-gato, *Ictalurus punctatus* (Patino et al., 1996).

Em muitas espécies de répteis a temperatura de incubação é o factor determinante do sexo fenotípico, e altas ou baixas temperaturas produzem ou fêmeas ou machos (Pieau et al., 1999). Nos répteis foi demonstrado que a temperatura exerce a sua acção nas vias metabólicas que levam à síntese dos esteróides sexuais (Crews e Bergeron, 1994; Pieau et al., 1994). É geralmente aceite que a temperatura regula a produção de androgénios e estrogénios que são, por sua vez, responsáveis pelo desenvolvimento dos testículos e ovários, respectivamente (Pieau et al., 1994b; Wibbels et al., 1994; Pieau et al., 1999). Além disso, foi demonstrada uma clara correspondência entre o período crítico de resposta às hormonas sexuais exógenas e o período crítico de resposta à temperatura: em anfíbios (Chardard et al., 1995), répteis (Crews, 1996) e peixes (Baroiller et al., 1995a, 1995b, 1999; Strüssmann e Patiño, 1995; Strussmann et al., 1996b). Recentes investigações em tartarugas demonstraram que a temperatura

influencia alguns genes envolvidos na cascata do determinismo do sexo, tal como a enzima aromatase (P450ar; Jeyasuria et al., 1998).

Nos teleósteos, a aromatase é também a enzima chave para a diferenciação do ovário. Dado que a aromatase catalisa a conversão de androgénios em estrogénios, a presença da enzima aromatase durante a gonadogénese dos peixes é um dos mecanismos que controla ou induz a diferenciação do ovário (Baroiller et al., 1999).

É também geralmente aceite que o desenvolvimento sexual é controlado por mecanismos de retroacção no eixo hipotálamo-pituitária-gónada (HPG) (Francis, 1992). O eixo HPG está potencialmente activo na altura da diferenciação sexual e os esteróides podem ter um efeito de retroacção neste eixo, como demonstrado em muitos salmonídeos (Saga et al., 1993; Feist e Schreck, 1996; Baroiller et al., 1999). No entanto, também é possível que a hormona de crescimento (GH) esteja envolvida no processo da diferenciação do sexo, uma vez que é sabido que a GH pode actuar na regulação da esteroidogénese nas gónadas de salmonídeos adultos (Baroiller et al., 1999).

Assim, a temperatura pode actuar em duas vias possíveis: por acção na pituitária, directamente ou via um termo-receptor, produzindo gonadotropina e a sua subsequente acção nas gónadas; ou então, com um efeito directo na gónada, ou nas enzimas esteroidogénicas ou na resposta da gónada à gonadotropina da pituitária. As enzimas requerem um óptimo de temperatura para a sua actividade, este óptimo define o aparecimento das hormonas sexuais e indirectamente a definição do sexo.

Tendo em conta que os esteróides sexuais orientam a diferenciação do sexo, foram propostos dois modelos teóricos para explicar as bases do determinismo do sexo dependente da temperatura (TSD). Assim, a temperatura pode actuar na razão androgénio/estrogénio e assim na actividade das enzimas 5 α -redutase/aromatase; ou a

temperatura pode actuar na transcrição do gene da aromatase e assim na abundância da enzima aromatase (Bogart, 1987; Pieau., 1996; Jeyasuria e Place, 1998; Baroiller et al., 1999). Nos peixes o androgénio considerado mais potente é a 11-cetotestosterona, se bem que outros esteróides 11-oxigenados sejam também potentes. Assim, para além da aromatase como enzima feminizante, as enzimas masculinizantes dos peixes podem incluir a 11 β -hidroxilase/11 β -hidroxiesteróide desidrogenase. Estas enzimas participam também na produção de corticosteróides pelo que, além da gónada, a interrenal pode ter um papel activo na diferenciação da gónada.

1.2. A glândula interrenal

Nos vertebrados, a glândula adrenal é uma glândula importante na produção de esteróides. Nos teleósteos, o tecido da adrenal está normalmente localizado na parte anterior do rim, e é designado por interrenal ou cabeça do rim (Bhattachary e Butler, 1979; Jung et al., 1981; Oguri, 1982). A interrenal é constituída por tecido linfóide (sempre presente) e células produtoras de esteróides. Tal como a glândula adrenal nos mamíferos, a interrenal nos peixes produz uma grande variedade de hormonas esteróides, especialmente glucocorticóides (cortisol e corticosterona), mineralocorticóides (deoxicorticosterona e possivelmente aldosterona) e androgénios da adrenal (androstenediona e 11 β -hidroxiandrostenediona, dehidroepiandrosterona e dehidroepiandrosterona sulfato) (Baulieu e Kelly, 1990).

A adrenal é constituída por três zonas: zona glomerulosa, zona fasciculata e zona reticularis, as quais possuem diferentes funções na produção de esteróides. Assim, na zona glomerulosa ocorre a síntese de mineralocorticóides e nas zonas fasciculata e reticularis ocorre a síntese de glucocorticóides e androgénios. (Baulieu e Kelly, 1990).

Muitos estudos têm demonstrado a função da hormona adrenocorticotrópica (ACTH-hormona da glândula pituitária) como reguladora do tecido da interrenal. Nos

peixes, não está descrita uma localização individualizada da adrenal e rim. Contudo, foram considerados diferentes modelos de localização do tecido da interrenal. Assim, as células da interrenal apresentam uma distribuição difusa na parte anterior do rim ou cabeça do rim (truta arco-íris; Oguri, 1982); estão localizadas à volta da veia cardinal posterior e suas ramificações (carpa comum; Nandi, 1962); estão embebidas na parede da veia cardinal posterior (enguia, *Anguilla anguilla*; Oguri, 1982); estão nas paredes das ramificações da veia cardinal posterior (*Fundulus heteroclitus*; Bara, 1968) e está localizada extraperitonealmente, separada do rim (peixe gato, *Clarias gariepinus*; Vermeulen et al., 1995).

1.3. Esteroidogénese

Os esteróides são compostos lipofílicos e facilmente atravessam a membrana das células (Feist et al., 1990), onde actuam como mensageiros químicos numa grande variedade de tecidos e influenciam muitos aspectos da biologia do organismo, incluindo a diferenciação sexual, a fisiologia da reprodução, a osmorregulação e o metabolismo. Quimicamente, as hormonas esteróides são moléculas lipídicas sintetizadas a partir do colesterol, através de desidrogenases e enzimas dependentes do citocromo P450 que catalisam reacções de hidroxilação e oxidação-redução. As enzimas esteroidogénicas encontram-se, maioritariamente, na membrana interna das mitocôndrias e retículo endoplasmático liso de células das gónadas e glândula interrenal (Kime, 1987).

Existem quatro grupos diferentes de esteróides: progestagénios, androgénios, estrogénios e corticosteróides que possuem, respectivamente, 21, 19, 18, 21 átomos de carbono.

Nos vertebrados, a síntese e secreção de hormonas esteróides é controlada, principalmente, pelas gonadotropinas (GtHs) e hormona adrenocorticotrópica (ACTH), ambas produzidas na pituitária. Nos peixes teleósteos, tal como nos mamíferos, foram

isoladas duas formas de gonadotropinas (GtHs) (Swanson et al., 1991): a GTH I e GTH II, análogas, respectivamente, da hormona folículo-estimulante (FSH) e hormona luteinizante (LH) dos mamíferos (Redding e Patiño, 1993). A GTH I está envolvida na esteroidogénese e gametogénese, enquanto que a GTH II está envolvida nas fases finais de maturação dos gâmetas.

As GTHs são responsáveis pela estimulação da síntese de esteróides sexuais (progestagénios, androgénios e estrogénios), os quais, por sua vez, actuam em tecidos alvo regulando todo o processo reprodutivo. Por outro lado, a ACTH estimula a síntese de corticosteróides nas glândulas interrenais. Os processos de regulação da síntese e secreção de esteróides são controlados por mecanismos de retroacção, ao nível do eixo hipotálamo-pituitária-gónada, nos quais concentrações elevadas de esteróides no sangue actuam em locais específicos do hipotálamo e da pituitária suprimindo a produção de GnRH (hormona libertadora da gonadotropina), GtHs ou ACTH.

1.4. Corticosteroidogénese

Nos peixes, numerosos estudos demonstraram a secreção de esteróides pelo tecido da interrenal. O cortisol é o corticosteróide mais abundante no sangue dos peixes e também o mais activo (Idler e Truscott, 1972; Passino, 1984), tendo sido considerado como um relevante indicador do grau de stress (Donaldson, 1981; Barton e Iwama, 1991).

Nos teleósteos parte do cortisol segregado pelo tecido da interrenal é reversivelmente ligado à proteína α -globulina transcortina (que é uma glicoproteína), ou à albumina no plasma, quando a capacidade de ligação à transcortina está saturada. O cortisol quando ligado é biologicamente inerte, uma vez que só o cortisol livre é fisiologicamente activo (Idler e Truscott, 1972). Nos teleósteos, o principal tecido alvo da acção dos corticosteróides é o fígado (Henderson e Garland, 1980), tendo sido

demonstrada uma alta expressão da enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase (11 β -HSD) neste órgão. Nos vertebrados, a resposta ao stress compreende numerosos processos fisiológicos, os quais são regulados pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Nos peixes, a hormona adrenocorticotrópica (ACTH) é considerada o factor dominante no controlo e síntese de cortisol pelas células da interrenal (Donaldson, 1981; Sumpter et al., 1994).

A libertação de cortisol pelo tecido da interrenal é controlada por um mecanismo de retroacção no eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI). Assim, o nível de cortisol em circulação tem um efeito directo (inibidor/estimulador) na pituitária, onde a ACTH é produzida. Mas, o cortisol também pode exercer uma acção de retroacção ao nível do hipotálamo, inibindo ou estimulando a libertação da hormona libertadora corticotrópica (CRH) que é transportada para a pituitária estimulando a produção da ACTH.

O principal efeito da libertação de corticosteróides (cortisol e corticosterona) pelo tecido da interrenal é a mobilização de energia de reserva (Chan e Woo, 1978; Lidman et al., 1979; Davis et al., 1985; Sheridan, 1986; Vijayan et al., 1991), capacitando, deste modo, os peixes de enfrentar o aumento de energia exigida, associada com o stress (Vijayan e Leatherland, 1990; Vijayan e Moon, 1992).

Nos anfíbios, répteis e aves, os esteróides mais abundantes da interrenal são corticosterona e aldosterona, em vez de cortisol.

Em algumas espécies de aves, a secreção de androgénios de origem testicular é acompanhada pelo aumento de corticosterona (hormona de resposta ao stress).

A observação (Selye, 1939) de que o stress é acompanhado por um aumento da actividade do eixo HPI e de um decréscimo nas funções reprodutivas sugeriu uma possível relação entre as hormonas do eixo HPI e as hormonas do eixo HPG. De facto, a hormona libertadora corticotrópica (CRH), a hormona adrenocorticotrópica (ACTH) e

os corticosteróides da interrenal têm um papel muito importante no controlo do efeito do stress nas funções reprodutivas. Nos mamíferos foi demonstrada uma inibição recíproca entre o eixo HPA e HPG. Por outro lado, quando as concentrações de glucocorticóides aumentam, verifica-se um aumento dos androgénios da glândula adrenal (Giustina e Wehrenberg, 1992).

Nos peixes, é bem evidente que o stress fisiológico tem efeitos inibidores no processo reprodutivo, tendo sido sugerido que esses efeitos são exercidos através do aumento dos níveis de cortisol, induzido pelo stress, actuando directamente na esteroidogénese da gónada. Neste contexto, foi demonstrado que, nos peixes o stress e o excesso de glucocorticóides reduzem a qualidade dos gâmetas, a qualidade (tamanho) dos ovos, inibem a ovulação, diminuem a taxa de sobrevivência e retardam a maturação sexual e o desenvolvimento.

1.5. Os esteróides sexuais e a diferenciação do sexo

Na ontogénese dos vertebrados, o sistema esteroidogénico desenvolve-se muito cedo. Nos humanos, os testículos começam a segregar testosterona e os ovários começam a segregar estradiol ao mesmo tempo no desenvolvimento embrionário, mas em diferentes estádios de diferenciação da gónada. A secreção de testosterona começa só após a diferenciação histológica dos testículos enquanto que a secreção de estradiol começa muito antes da diferenciação do ovário (Wilson et al., 1981).

Nos teleósteos, os níveis de esteróides endógenos durante a diferenciação sexual foram examinados, pela primeira vez, por Rothbard et al. (1987). Durante o desenvolvimento embrionário e estádios iniciais do desenvolvimento, foram demonstradas alterações nos níveis de esteróides sexuais endógenos em tilápia (Rothbard et al., 1987), salmão (Feist et al., 1990) e trutas (Feist e Schreck, 1996; Yeoh et al., 1996a). Geralmente, o desenvolvimento dos embriões exibem altos níveis de

esteróides sexuais após a fertilização, e os níveis diminuem durante a absorção do saco vitelino e aumentam durante o desenvolvimento dos peixes. Feist et al. (1990) sugeriram que estas alterações nos níveis de esteróides durante o desenvolvimento reflectem o processo metabólico inicial dos esteróides maternos dos embriões com subsequente síntese de esteróides pelos peixes. Em muitas espécies de teleósteos, estudos histoquímicos demonstraram que as enzimas metabólicas dos esteróides e células produtoras de esteróides ocorrem em alturas específicas durante o desenvolvimento inicial (Takahashi e Iwasaki, 1973; Satoh, 1974; Schreibman et al., 1982; Kanamori et al., 1985; Nakamura e Nagahama, 1989; Nakamura et al., 1993). A conversão de precursores de esteróides *in vitro* foi demonstrada na truta (van den Hurk et al., 1982; Antila, 1984) e tilápia do Nilo (Baroiller et al., 1986).

Alterações nos níveis de esteróides no desenvolvimento inicial dos peixes, antes da diferenciação da gónada, indicam um possível papel dos esteróides na cascata da diferenciação do sexo (Feist et al., 1990; Yeoh et al., 1996a), o que está de acordo com a hipótese de que a capacidade biossintética dos esteróides precede a diferenciação da gónada (Hines et al., 1999). Estas observações suportam a teoria, geralmente aceite, de que, nos teleósteos os androgénios e estrogénios estão envolvidos na diferenciação do sexo e que altos níveis destas hormonas podem afectar o sexo fenotípico (Yamamoto, 1969). Além disso, Bogart (1987) sugeriu que o sexo da gónada é determinado pela razão androgénio/estrogénio com relativamente altas ou baixas razões permitindo o desenvolvimento dos testículos ou ovários, respectivamente.

Rothbard et al. (1987), nas suas investigações em três espécies de tilápia demonstraram alterações nos níveis de esteróides antes, durante e depois do período da diferenciação sexual e concluíram que entre os esteróides examinados (testosterona, 11-cetotestosterona e estradiol-17 β), só a testosterona reflectia o processo da diferenciação

sexual, o que está de acordo com a observação de que a bimodalidade dos níveis de testosterona e o diferencial metabolismo dos esteróides no desenvolvimento pode reflectir o início da divergência sexual (Hines et al., 1999). Em tilápia do Nilo foram demonstradas alterações nos níveis dos esteróides antes, durante e depois de evidências histológicas da diferenciação da gónada (Hines et al., 1999).

Os mecanismos da diferenciação sexual e da inversão do sexo são ainda pouco conhecidos nos peixes, mas os esteróides têm um efeito directo nas gónadas dos peixes. Assim, os androgénios actuam como andro-indutores (masculinização) e os estrogénios como gino-indutores (feminização) (Baroiller et al., 1999). A inversão do sexo só é possível se os compostos, androgénios e estrogénios, forem administrados durante o estágio indiferenciado do desenvolvimento da gónada, e mantidos até à altura em que as gónadas estejam completamente diferenciadas (Yamamoto, 1969). A eficácia da aplicação dos esteróides exógenos em inverter o sexo da gónada nos peixes sugere, fortemente, que os esteróides estão envolvidos no processo natural da diferenciação do sexo, tal como realçado por Yamamoto (1962, 1969).

Foi demonstrado que a administração de um esteróide androgénico (MacIntosh et al., 1985; Torrans et al., 1988; Guerrero e Guerrero, 1993) ou de um esteróide estrogénico (Yoshikawa e Oguri, 1978; Jensen e Shelton, 1979; Hopkins et al., 1979), em tilápia antes do período da diferenciação da gónada produz desvios significativos, na razão dos sexos, o que sugere que os esteróides sexuais estão envolvidos na diferenciação da gónada, também nesta espécie.

1.6. O cortisol e a diferenciação sexual

Foi demonstrada a presença de cortisol nos estádios iniciais do desenvolvimento, incluindo em ovos fertilizados, embriões e larvas de tilápia e truta arco-íris. Em tilápia ocorrem altas concentrações de cortisol em ovos fertilizados, verificando-se grandes

alterações durante o desenvolvimento embrionário e larvar. No entanto, a presença de cortisol em ovos de tilápia pode ser de origem maternal, dado que os órgãos, incluindo a interrenal, ainda não estão desenvolvidos (Wu, 1990).

Foi demonstrado que nos estádios iniciais do desenvolvimento o eixo HPI é activado durante o stress. Muitos estudos demonstraram alguns efeitos dos corticosteróides na diferenciação sexual, tendo sido sugerida a sua conversão em androgénios 11-oxigenados. Os androgénios 11-oxigenados, incluindo 11-cetotestosterona (11-KT), 11 β -hidroxiandrostenediona (11 β -OHA) e 11 β -hidroxitestosterona (11 β -OHT), são androgénios muito potentes determinantes do fenótipo macho (Kime et al., 1991; Guiguen et al., 1995).

Na truta arco-íris, a administração de cortisol e cortisona, altera a proporção dos sexos a favor dos machos (van den Hurk e Leeman, 1984), o que sugere que estes corticosteróides exógenos, provavelmente, foram convertidos em androgénios 11-oxigenados, particularmente importantes para a diferenciação do desenvolvimento inicial dos testículos nesta espécie. Van den Hurk et al. (1982), observaram que só após a diferenciação das gónadas é que estas podem converter androstenediona em 11 β -OHA, o que sugere que a actividade da enzima 11 β -hidroxilase está ausente no estádio indiferenciado das gónadas. Contudo, estudos experimentais no salmão (Fitzpatrick, 1990) demonstraram a capacidade da interrenal e das gónadas em produzir cortisol, cuja síntese requer a actividade da enzima 11 β -hidroxilase. No entanto, a interrenal é um potencial local para a conversão de androstenediona em 11 β -OHA através da actividade da enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase (11 β -HSD), e pode ter um papel importante na masculinização das gónadas (van den Hurk e Leeman, 1984; van den Hurk e van Oordt, 1985). Na truta arco-íris, foi observada a masculinização após o

tratamento com 11 β -OHA, enquanto que o tratamento com androstenediona não teve qualquer efeito (van den Hurk e van Oordt, 1985).

Foi demonstrado que durante as fases do desenvolvimento da puberdade no macho do peixe gato, *Clarias gariepinus*, a 11 β -OHA é o principal produto resultante da esteroidogénese testicular, *in vitro*, enquanto que 11-KT é o androgénio dominante no plasma. Isto sugere que 11 β -OHA de origem testicular é convertida em 11-KT em lugares extratesticulares. Ambos os androgénios 11-oxigenados (11 β -OHA e 11-KT) são necessários para induzir e/ou acelerar a puberdade do macho *Clarias gariepinus* (Cavaco et al., 1997).

Cortisol, 5 α -androstenediona, 5 β -androstenediona e androstenediona, são os esteróides mais abundantes produzidos pela interrenal de *Clarias gariepinus in vitro* (Vermeulen et al., 1995). A androstenediona é também o androgénio predominante produzido *in vitro* pela interrenal de porco da Índia (Hyatt et al., 1983; Bélanger et al., 1990), tilápia de Moçambique (Balm et al., 1989) e truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Arai et al. 1969). Muitos dos esteróides presentes no plasma após castração do peixe gato (Vermeulen et al., 1994) foram identificados em incubações da interrenal. No entanto, a 11 β -OHT e a 11-KT não foram detectados, embora estivessem presentes no plasma após castração, o que indica a presença de uma conversão periférica de um esteróide precursor na adrenal nestes dois esteróides (Hansson e Gustafsson, 1981; Schulz e Blüm, 1991). Os esteróides testiculares presentes no plasma de *Clarias gariepinus* após castração são originados na interrenal (Vermeulen et al., 1995).

Kime (1978) e Schulz (1986) demonstraram *in vitro*, que o fígado da truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) pode metabolizar (através da enzima 11 β -HSD) a 11 β -OHA em 11-KT. Assim, é possível que o cortisol da interrenal dos peixes possa ser convertido em 11 β -OHA e 11-cetoandrostenediona pelo fígado e subsequentemente em 11 β -OHT e

11-KT pelas células do sangue, funcionando como uma fonte extra de esteróides antes do desenvolvimento da gónada.

1.7. Efeito da dexametasona na esteroidogénese

Nos mamíferos, a dexametasona (corticosteróide sintético) é muito mais potente que os corticosteróides naturais (cortisol e cortisona) (Burton et al., 1967), suprimindo a secreção da ACTH endógena (Beaven et al., 1964; Purves e Siret, 1965).

Nos peixes, foi demonstrado que a administração de dexametasona bloqueia a libertação da ACTH e, conseqüentemente, inibe a síntese de cortisol em *Salmo gairdneri* (Donaldson e McBride, 1967) e, *Salmo trutta* L. (Pickering, Pottinger e Sumpter, 1987).

Nos mamíferos, há indicações de que a dexametasona causa um completo bloqueio na libertação de cortisol (James et al., 1968), enquanto que, em algumas espécies de peixes, foi observado que um nível basal de cortisol era mantido no plasma, mesmo durante o período imediatamente após o tratamento com dexametasona, e aumentando a dose de dexametasona, as concentrações de cortisol não diminuíam significativamente.

2. A biologia de *Oreochromis mossambicus*

A tilápia de Moçambique, é um teleóstéo da família Cichlidae, pertencente à ordem Perciformes e classe Actinopterygii, que se encontra largamente distribuído pelas águas africanas intertropicais.

Oreochromis mossambicus é uma espécie robusta de fácil manutenção e reprodução em cativeiro, apresentando grande resistência à variação dos factores físico-químicos: temperatura, salinidade, oxigénio e pH. É uma espécie euritérmica que, na sua zona de distribuição natural, ocorre em águas com uma variação de temperatura entre 17 e 35°C. No entanto, noutros habitats, esta espécie pode suportar uma amplitude térmica entre 13

e 38°C, sendo os seus limites de tolerância térmicos determinados experimentalmente de 8 a 43°C (Chervinski, 1982; Philippart e Ruwet, 1982). Contudo, estes limites letais variam em função do stock testado e do seu grau de aclimação. Allanson e Noble (1964) referem 38,2°C como limite letal superior de temperatura. Considera-se como temperatura de crescimento óptima 27-28°C. A 12°C o crescimento cessa e a 9°C a temperatura torna-se letal (Bardach et al., 1972). *Oreochromis mossambicus* tolera melhor baixas temperaturas em água salgada do que em água doce (Allanson et al., 1971). Em água doce *Oreochromis mossambicus* atinge o coma a 11°C, devido a um decréscimo da osmolaridade do plasma e das concentrações iónicas de sódio e cloro; à mesma temperatura, mas em água salobra (5 ‰) não se verifica nenhuma destas reacções (Allanson et al., 1971).

Oreochromis mossambicus é uma espécie eurialina que sobrevive num largo espectro de salinidades, sendo considerada muito tolerante a altas salinidades (Dial e Wainright, 1983; Fontainhas-Fernandes, 2002). A natureza eurialina desta espécie tem sido explorada em aquacultura, existindo explorações em ambientes estuarinos e mesmo em água salgada (Payne, 1983).

As tilápias em geral, mas *Oreochromis mossambicus* em particular, são resistentes a níveis baixos de oxigénio na água e conseguem sobreviver em massas de água extremamente reduzidas. Por outro lado, as tilápias suportam também elevadas concentrações de dióxido de carbono na água, bem como de outros gases tóxicos resultantes da decomposição de matéria orgânica (NH₃, H₂S) (Philippart e Ruwet, 1982).

Para as tilápias, o limite letal de acidez é aproximadamente de pH 4,0 e o limite letal de alcalinidade é de pH 11,0, sendo o pH 7,0-8,0 o recomendado para culturas comerciais (Chervinski, 1982).

Oreochromis mossambicus é uma espécie omnívora com preferência planctonófaga.

É, ainda, uma espécie poligâmica e sexualmente dimórfica com incubação bucal materna dos ovos e larvas (Fryer e Iles, 1972; Kuwamura, 1986).

Em *Oreochromis mossambicus*, no início da época da reprodução, os machos adoptam uma coloração nupcial. Cada macho estabelece um território no substrato, no qual escava um ninho (Fryer e Iles, 1972). Os ninhos encontram-se agregados em arenas reprodutoras. Durante esta época os machos reduzem a sua actividade alimentar devido à fraca disponibilidade de alimento nas arenas reprodutoras (Bowen, 1984). Em cativeiro, por vezes, a falta de disponibilidade de substrato de nidificação pode anular a existência de ninhos individuais existindo uma compactação de territórios reprodutores (Barlow, 1974). Na altura do acasalamento, os machos atraem as fêmeas para os seus ninhos através de uma sequência de corte bem definida. A fêmea entra no ninho onde deposita os ovos recolhendo-os de imediato com a boca e armazena-os numa bolsa mandibular. Durante a sequência da corte, quer antes quer depois da oviposição, a fêmea é atraída para a região genital do macho, recolhendo com a boca o esperma ejaculado pelo macho, dando lugar à fertilização dos ovos. Os ovos fertilizados são incubados na boca da progenitora, atingindo a eclosão passados 2-5 dias. As larvas ficam na boca da progenitora até reabsorverem todo o saco vitelino (cerca de 9-10 dias, após a fertilização), altura em que se tornam juvenis, embora possam voltar à boca da progenitora sempre que se sentirem ameaçados nos 10 a 15 dias seguintes (Bardach et al., 1972). A progenitora durante este período reduz a sua actividade alimentar.

As jovens tilápias tornam-se sexualmente aptas 2 a 3 meses após a fertilização, variando este estado de maturidade sexual em função das condições ambientais. Em condições óptimas de crescimento, atingem 6 a 10 cm de comprimento, podendo crescer continuamente ao longo de toda a sua vida (Bardach et al., 1972; Marcel, H. 1983).

A uma temperatura óptima (27-28°C), as tilápias reproduzem-se continuamente, tendo lugar uma época de reprodução, aproximadamente de 15 em 15 dias.

Em ambientes instáveis, com temperaturas perto dos limites de tolerância da espécie, e com grandes flutuações dos níveis de água, *Oreochromis mossambicus* apresenta um estilo de vida caracterizado por uma maturação sexual precoce, aumento da fecundidade, diminuição do tamanho dos ovos e uma menor longevidade (James e Bruton, 1992).

Oreochromis mossambicus é uma espécie com interesse económico para a piscicultura (Pullin, 1983, 1991). As razões para o sucesso das espécies do género *Oreochromis* em geral e da espécie *Oreochromis mossambicus* em particular, nas explorações de aquacultura, são as seguintes:

a) A versatilidade da alimentação, que pode variar entre a herbívora e a detritívora, podendo mesmo consumir peixes de pequena dimensão, e a fácil adaptação às rações comerciais (Pullin, 1991);

b) A facilidade de reprodução em cativeiro (Pullin, 1991);

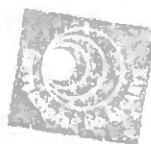
c) As taxas de crescimento bastante rápidas, sendo *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* e *Oreochromis aureus* as espécies com maior potencial (Pauly et al., 1988); no entanto, problemas de nanismo e menores taxas de crescimento têm levado a que *Oreochromis mossambicus* tenha vindo a ser preterida em favor de *Oreochromis niloticus* e *Oreochromis aureus* nas pisciculturas, embora *Oreochromis mossambicus* ainda continue a ser uma das principais espécies cultivadas no continente africano (Pullin, 1991);

d) Fácil adaptação a águas salobras ou mesmo salgadas, existindo actualmente explorações de aquacultura em ambientes estuarinos e marinhos (Payne, 1983).

3 - Objectivos do presente trabalho

Os objectivos deste trabalho foram os seguintes:

- 1) Determinar se a temperatura influencia a diferenciação sexual do mesmo modo que foi demonstrado para *Oreochromis niloticus* por Baroiller et al. (1995);
- 2) Determinar as principais diferenças na esteroidogénese de larvas de tilápia incubadas a temperaturas diferentes;
- 3) Determinar o efeito da temperatura na produção de androgénios e cortisol pela interrenal;
- 4) Determinar o efeito de um anti-corticosteróide (dexametasona) na diferenciação sexual.



II – MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e Materiais

As hormonas, a dexametasona, os reagentes para o meio de cultura, o 2-fenoxietanol e a solução de Bouin foram adquiridos a Sigma-Aldrich Chemical Co (Madrid, Espanha) ou Steraloids (Newport, RI). O precursor radioactivo [³H]-17 progesterona (250 µCi/nmol de actividade específica) foi adquirido à Amersham Life Science (Buckinghamshire, England). As placas de incubação de 24 poços foram adquiridas a Costar Corporation, Cambridge, MA. As placas de cromatografia em camada fina (TLC), os cartuchos de fase sólida, a solução de eosina e a solução de hematoxilina foram adquiridas a Merck. O etilenodiaminotetra-acetato (EDTA) foi adquirido a Pharmacia Biotech.

Extracção de esteróides

Ovos e larvas individuais foram homogeneizados com água destilada (0,5 ml), seguindo-se a extracção do homogenato através de cartuchos de fase sólida (SEP-PAK_r VAC C18 3CC 500mg, Waters). Os cartuchos foram activados previamente com 2x2 ml de etanol absoluto seguido de 4 ml de água destilada. A amostra foi depois passada e os esteróides eluídos com etanol absoluto (2x2ml). O etanol contendo o extracto foi evaporado com azoto gasoso a 37°C. As amostras foram ressuspensas em 0,5 ml tampão fosfato com gelatina 0,1 M pH 7,6 e guardadas a -20°C para posterior análise. Os meios de incubação foram extraídos também através de cartuchos de fase sólida seguindo o mesmo procedimento, mas os extractos foram ressuspensos em 1 ml de tampão fosfato com gelatina 0,1 M pH 7,6, no caso de ser para quantificação por radioimunoensaio ou em 200 µl de etanol , no caso de conterem esteróides radioactivos sendo depois aplicados em placas de cromatografia.

Quantificação dos níveis de esteróides

Os esteróides 11-cetotestosterona, 17 β -estradiol, testosterona e cortisol foram quantificados por radioimunoensaios (RIAs), usando metodologias descritas por Scott e Canário (1992) e Canário e Scott (1989). As reacções cruzadas para estes radioimunoensaios (RIAs) foram detalhadas em Condeça e Canário (2001).

Determinação do perfil de androgénios e estrogénios a 26°C e a 36°C durante o desenvolvimento

Os ovos de tilápia de Moçambique foram recolhidos após a fertilização de uma só fêmea a partir de um conjunto de reprodutores mantido a 26°C, e foram imediatamente incubados a 26°C em incubadores de plástico flutuantes com um fundo de rede para permitir o arejamento.

Ao sétimo dia, após a fertilização, foram retirados três grupos de dez larvas cada, que foram guardadas em tubos Eppendorf e congeladas em azoto líquido e depois guardadas a -80°C. As restantes larvas foram divididas em dois grupos com igual número de indivíduos (n = 148) e mantidas a 26°C e a 36°C, respectivamente. A experiência decorreu em aquários de vidro de circuito fechado com 65 l de água e arejamento constante. A partir do décimo dia, após a fertilização, os dois grupos experimentais foram igualmente alimentados, uma vez por dia até saciação, com alimento comercial ("Tetramin flakes"). De cada aquário experimental foram ainda recolhidos cinco peixes aos dias 12, 17, 22, 27 e 32, após a fertilização. Para o efeito os peixes foram anestesiados com 2 - fenoxietanol (0,15 ml/l), registados o comprimento (mm) e o peso (mg), sendo depois guardados individualmente em tubos Eppendorf que foram imediatamente congelados em azoto líquido e mantidos a -80°C para posterior extracção.

Efeito da temperatura (26°C e 36°C) e da dexametasona na diferenciação sexual

A experiência decorreu nas condições experimentais descritas anteriormente. Primeiramente foi testado o efeito só da temperatura a 26° e a 36°C (Exp.I. n=148). Os ovos provinham de uma única fêmea sendo sacrificados por uma dose em excesso de anestésico aos 50 dias após a fertilização, altura em que foram medidos e pesados, a cabeça e a região caudal pós-anal removidas e a porção abdominal contendo as gónadas fixada em Bouin.

Numa segunda experiência, e para testar o efeito da temperatura e da dexametasona (Exp.II.1. n=58; Exp.II.2. n=86; Exp.II.3. n=115), aos 7 dias após a fertilização, foi mantido um grupo a 26°C como acima referido (grupo controlo para o efeito da temperatura), enquanto que a 36°C foram criados dois grupos, um recebendo como alimento “Tetramin flakes” vaporizados com etanol absoluto (grupo controlo para o efeito da dexametasona), e o outro recebendo alimento vaporizado com 0,15 mg de dexametasona em etanol absoluto /g de alimento. Todos os grupos recebiam aproximadamente a mesma alimentação duas vezes por dia.

O alimento vaporizado com dexametasona ou só com etanol ficou a evaporar, durante a noite, à temperatura ambiente.

Efeito da ACTH e da temperatura na produção *in vitro* de androgénios e cortisol, pela interrenal

Os peixes usados na experiência eram provenientes de um mesmo stock. Foram aclimatados três peixes adultos, de ambos os sexos, a 26°C, e outros três peixes adultos, também de ambos os sexos, a 36°C, em tanques de fibra de vidro de circuito fechado com 150 l de água e arejamento constante, durante oito dias. Os peixes dos dois grupos experimentais foram igualmente alimentados, uma vez por dia, com alimento comercial

("Tetramin flakes"). A experiência foi realizada três vezes para cada uma das temperaturas.

Para as incubações *in vitro* os peixes foram anestesiados com 2-fenoxietanol (0,15 ml/l) e sacrificados com um corte na espinal medula na região occipital. O tecido da interrenal de cada peixe foi removido para uma solução de Ringer (Jalabert and Fostier, 1984) e mantida no gelo, onde foi cortado em pequenos fragmentos de ± 10 mg.

Procedeu-se à pré-incubação dos fragmentos da interrenal, *in vitro*, durante quatro horas, em placas com 24 poços, contendo cada poço 1 ml de solução de Ringer. Após a pré-incubação e para estimular a esteroidogênese, foram adicionadas, em duplicado, diferentes concentrações de ACTH (0,4 m e 50 m U.I.). Não foram adicionados cofactores. O controlo, também em duplicado, consistiu em fragmentos de tecido da interrenal incubados em 1 ml de solução de Ringer, sem hormona.

As incubações decorreram a 26°C e a 36°C (de acordo com a origem dos peixes dadores) numa atmosfera com oxigénio, em agitação constante (20 rpm). Após as quatro horas, foi recolhido o meio de incubação (1ml) que foi imediatamente congelado em azoto líquido e guardado a -20°C para posterior extracção e radioimunoensaio.

Efeito da temperatura na esteroidogênese da interrenal usando precursores radioactivos

Os peixes foram aclimatados e os procedimentos para retirar a interrenal e para as incubações foi como indicado na experiência anterior, mas desta vez os fragmentos de interrenal (± 10 mg) em 1 ml de solução de Ringer foram incubados com o precursor radioactivo [³H]-17-hidroxiprogesterona (2 μ Ci).

As incubações decorreram a 26°C e a 36°C numa atmosfera saturada com oxigénio em agitação constante (20 rpm) por um período de quatro horas. Após duas horas de

incubação foi recolhido meio de incubação (400 µl) e passadas quatro horas foi recolhido o restante meio de incubação (600µl), que foi, imediatamente, congelado em azoto líquido e guardado a -20°C, para posterior extracção.

Histologia das gónadas

Cada peça contendo as gónadas foi fixada numa solução de Bouin, durante dois dias, após os quais, todas as amostras foram transferidas para álcool a 70° com EDTA a 0,1 M, onde permaneceram durante oito dias, para facilitar a descalcificação do osso e permitir um melhor corte. Após este período, fez-se o processamento e a inclusão em parafina. Foram realizados cortes transversais (8 µm), fez-se a coloração com hematoxilina e eosina (H&E).

Para a identificação das gónadas foram usadas descrições do desenvolvimento das gónadas em tilápia do Nilo (Nakamura e Nagahama, 1985, 1989 e 1998).

Separação de metabolitos radioactivos em cromatografia em camada fina (TLC)

Os metabolitos radioactivos foram separados por cromatografia de camada fina (TLC) fase normal, em placas de sílica (Whatman LK6DF sílica gel 60-Å). A aplicação das amostras em TLC foi realizada com diclorometano e os cromatogramas desenvolvidos à temperatura ambiente durante cinquenta minutos com clorofórmio: metanol (48: 2) como fase móvel. As amostras continham um dos dois grupos de esteróides padrão 1) androstenediona, testosterona e 11β-hidroxitesterona e 2) androstenetriona e 11-cetotesterona. A posição dos metabolitos na placa foi detectada com um “radiocromatograph Bioscan” (Lablogic, Sheffield, Inglaterra) e software Win-Scan. A cada fracção radioactiva (pico) foi atribuída uma letra, tendo sido calculada a proporção relativa de cada pico relativamente aos metabolitos globais. Cada fracção

isolada foi raspada para um tubo de vidro com tampa a que se adicionaram 500µl de água destilada. Procedeu-se depois à extração de esteróides livres com éter dietílico (2 x 4 ml) usando métodos descritos por Canário e Scott (1989a); Scott e Canário (1992). Este foi evaporado com azoto gasoso a 37°C. As amostras foram ressuspendidas em 1 ml de etanol absoluto e guardadas a -20°C para posterior caracterização microquímica.

Caracterização dos metabolitos radioactivos

Para caracterização dos diferentes metabolitos foram realizadas reacções microquímicas (oxidações por bismutato de sódio, trióxido de crómio) baseadas em protocolos descritos por Bush (1961) com modificações descritas por Canário e Scott (1989 b) e Kime (1978). A verificação da efectividade das reacções foi feita através da alteração da mobilidade em TLC nos sistemas I – clorofórmio:metanol (49:1); II – clorofórmio:metanol (49,5:0,5); III – clorofórmio:metanol(48:2) IV – clorofórmio. Inicialmente, foi investigada a identidade dos metabolitos dos picos isolados através da oxidação com bismutato de sódio, contendo como padrões referência 2 µg de cortisol e 17-hidroxiprogesterona. Os produtos foram separados em TLC, sistema I.

Com os metabolitos que reagiram positivamente foi verificado se comigravam com esteróides conhecidos e aos mais abundantes foi feita oxidação com trióxido de crómio. Os esteróides com dupla ligação entre C4 e C5 (esteróides 4-ene) foram detectados por absorção de luz ultravioleta (UV) a 254 nm. Os esteróides 5(α, β) reduzidos com grupos hidróxilo foram detectados por imersão das placas de TLC em ácido fosfomolíbico a 5% em etanol (w/v) e posterior secagem na estufa a 110°C, durante quinze minutos. Os esteróides 5(α, β) reduzidos, contendo principalmente grupos cetónicos, foram vaporizados com uma solução de hidróxido de benziltrimetilamónio: 0,5% n-dinitrobenzeno em etanol (1:2) (Fluka Chemie AG, Buchs, Suíça).

Foram utilizados os seguintes critérios de caracterização dos metabolitos:

- a) Metabolito C – Reagiu positivamente com trióxido de crómio originando um produto que comigrava com 5α -androstanetriona (sistema IV).
- b) Metabolito G – Reagiu positivamente com trióxido de crómio originando metabolitos que comigravam com 5β -androstanetriona e 5α -androstanediona (sistema IV).
- c) Metabolito M – Reagiu positivamente com trióxido de crómio originando um produto que comigrava com androstenediona e 5β -androstanediona (sistema IV).
O metabolito M parece pertencer ao grupo dos esteróides Δ^4 (não reduzidos) mas estando misturado com outros esteróides tornou difícil a sua identificação.
- d) Metabolito E - comigrava com $17,20\alpha$ -dihidróxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\alpha$ -P) (sistema II).

Análise estatística

O efeito da temperatura e da idade nos níveis de hormonas foi analisado por Análise de Variância (ANOVA) a duas entradas, seguindo-se o teste de Tukey.

Para a análise estatística dos metabolitos radioactivos das incubações foi aplicada a análise de variância (ANOVA), a uma entrada separadamente, para a percentagem de cada um dos picos produzidos, comparando as duas temperaturas (factores) e para as duas horas e quatro horas de incubação. Para os picos que deram diferenças significativas fomos tentar investigar a sua possível identidade por comigração com esteróides semelhantes. O nível de significância considerado foi de 5%.

III – RESULTADOS

1 – Perfil de androgénios e estrogénios durante o desenvolvimento e a diferenciação sexual a 26°C e a 36°C

Não se observou um efeito significativo da temperatura ou da idade dos peixes nos níveis de 11-cetotestosterona (11KT) e estradiol (E2) (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados da análise de variância a duas entradas do efeito da temperatura e idade dos peixes na concentração de 11-cetotestosterona e estradiol (df, graus de liberdade).

Fonte de variação	Soma de quadrados	df	Quadrados médios	Razão F	P
11-cetotestosterona					
Modelo	26.915	10	2.691	1.688	0.115
Erro	68.566	43	1.595		
Estradiol					
Modelo	43.163	10	4.316	1.830	0.084
Erro	101.433	43	2.359		

Para ambas as hormonas existe uma variabilidade bastante elevada, sobretudo aos 12 dias após a fertilização, onde há também uma tendência para os níveis médios de hormonas serem mais elevados (Figuras 1 e 2).

A razão entre os níveis das duas hormonas também não apresenta variações significativas em função da temperatura e da idade (Tabela 2). No entanto parece haver uma tendência a 36°C para a existência de níveis mais elevados aos 17 e 27 dias (Figura 3).

Tabela 2 - Resultados da análise de variância a duas entradas do efeito da temperatura e idade dos peixes no rácio 11-cetotestosterona/estradiol (df, graus de liberdade).

Fonte de variação	Soma de quadrados	df	Quadrados médios	Razão F	P
Modelo	187.118	10	18.712	0.843	0.591
Erro	954.098	43	22.188		

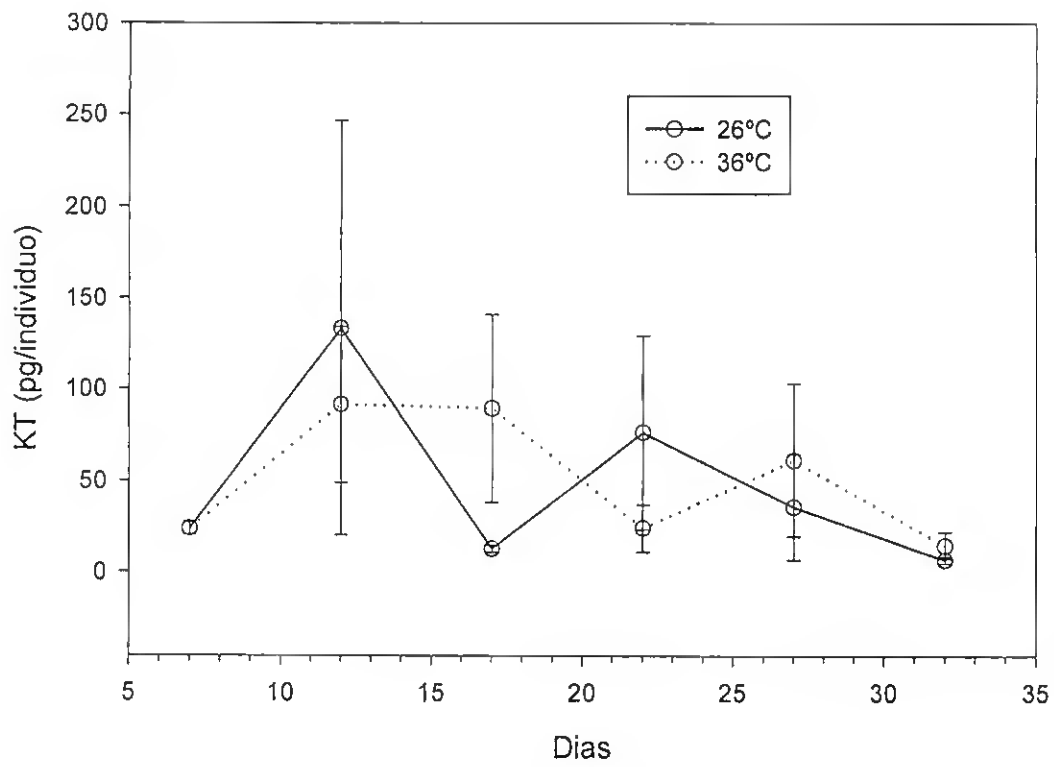


Figura 1 - Efeito da temperatura no conteúdo de 11-cetotestosterona na tilápia de Moçambique durante os primeiros 35 dias após a fertilização.

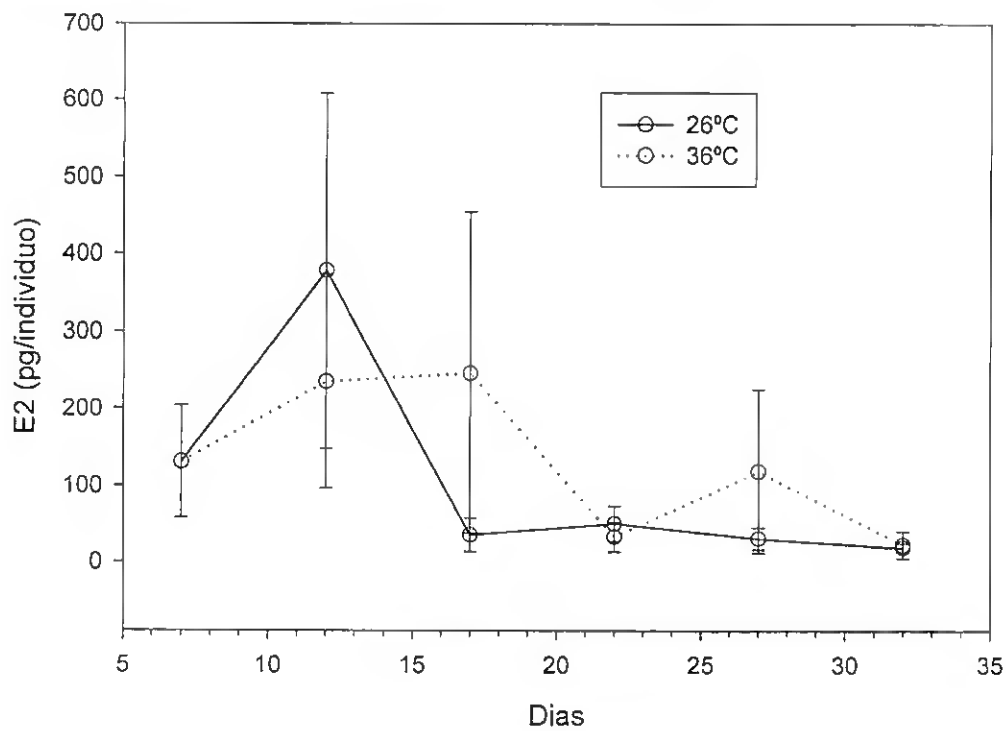


Figura 2 - Efeito da temperatura no conteúdo de 17β-estradiol na tilápia de Moçambique durante os primeiros 35 dias após a fertilização.

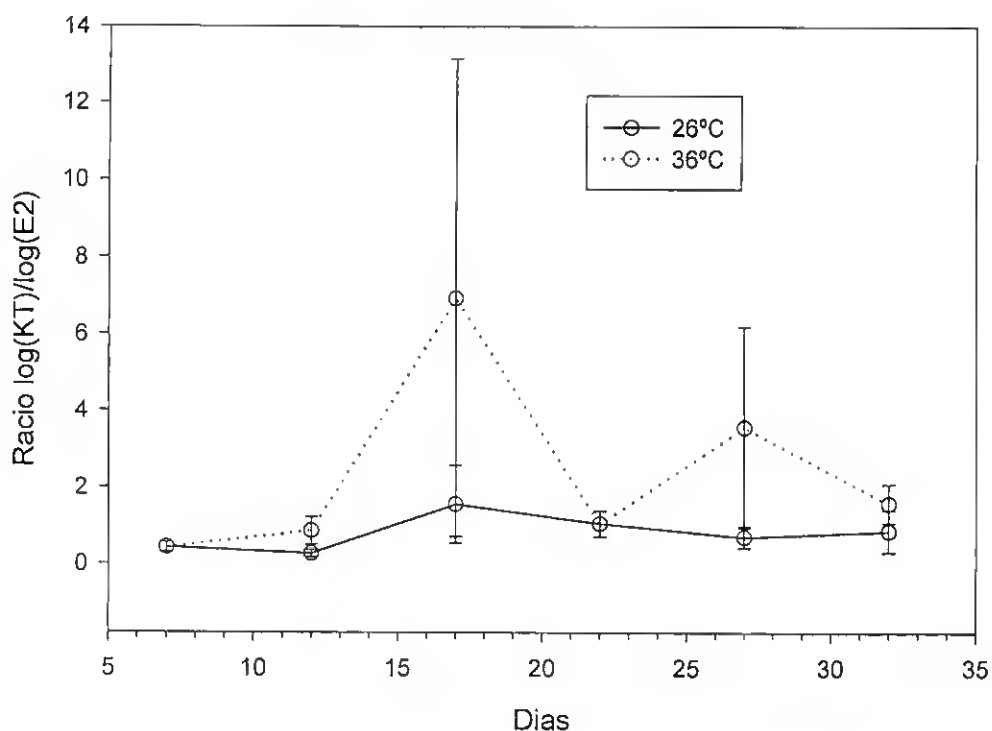


Figura 3 - Efeito da temperatura no rácio 11-cetotestosterona/ 17 β -estradiol na tilápia de Moçambique durante os primeiros 35 dias após a fertilização.

2- Efeito da temperatura e da dexametasona na diferenciação sexual

Da observação histológica das gónadas da tilápia de Moçambique, verificou-se que as gónadas se encontram numa posição ventral relativamente à bexiga natatória, estando suspensas do peritoneu, que envolve toda a massa visceral, através do mesentério (Figura 4).

Os ovários apresentam ovócitos perinucleares com citoplasma homogéneo, núcleo circular e numerosos nucléolos. A cavidade do ovário era bem visível, o mesmo não acontecendo com as estruturas lamelares (Figura 4 - A, C, D). Num estágio mais avançado do desenvolvimento observam-se estruturas lamelares bem definidas e compartimentação dos ovócitos. (Figura 4 - F, G). Os testículos apresentam espermatogónias e espermatócitos (Figura 4 - B, E).

Nas gónadas dos peixes tratados com dexametasona não se verificou qualquer alteração na morfologia do tecido (Figura 4 - E).

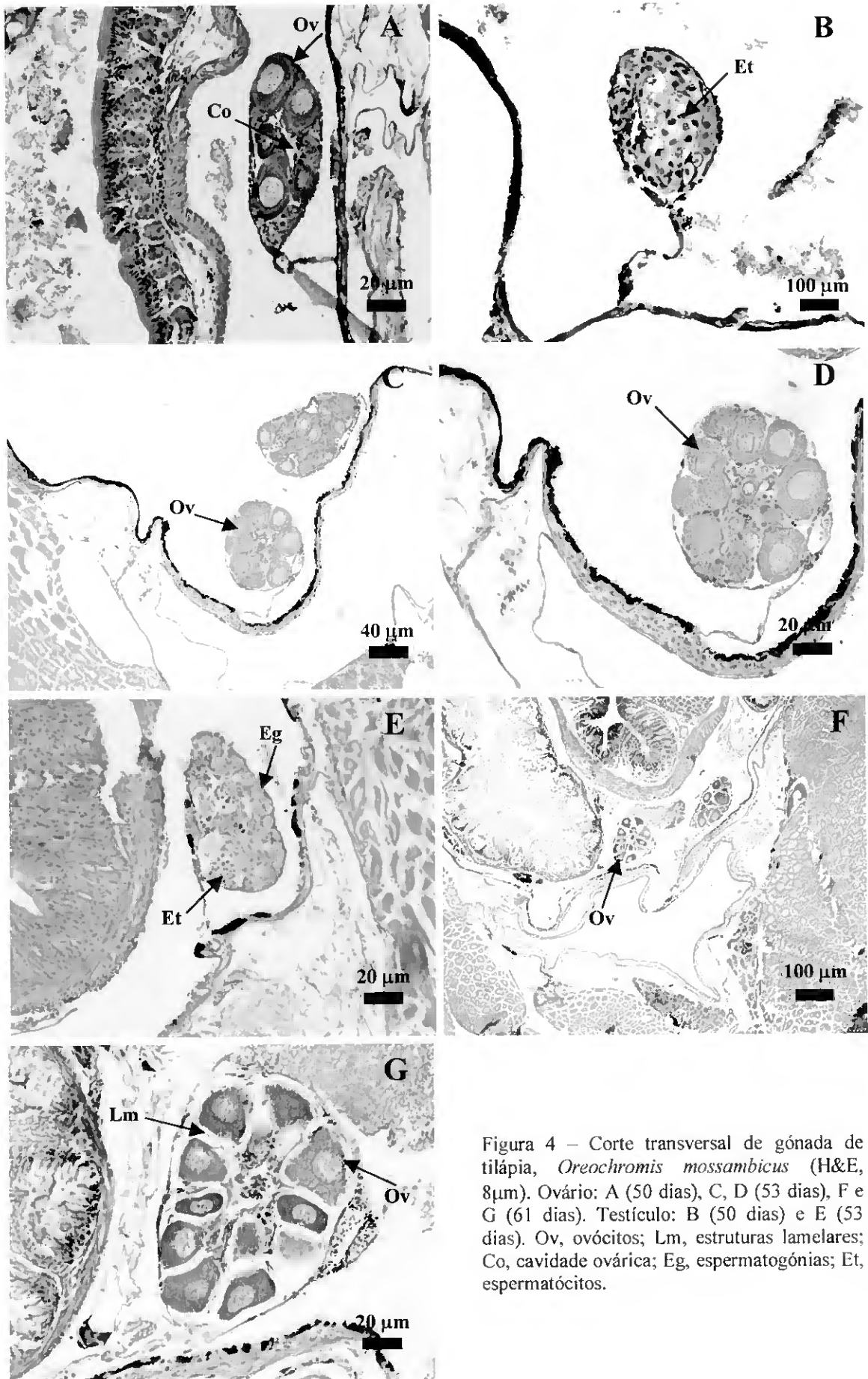


Figura 4 – Corte transversal de gónada de tilápia, *Oreochromis mossambicus* (H&E, 8μm). Ovário: A (50 dias), C, D (53 dias), F e G (61 dias). Testículo: B (50 dias) e E (53 dias). Ov, ovócitos; Lm, estruturas lamelares; Co, cavidade ovárica; Eg, espermatogónias; Et, espermatócitos.

A temperatura (Exp.I) elevada (36°C) tem um efeito significativo no aumento da percentagem de machos (58,3%), comparando com o controlo (26°C), tal como verificado em estudos anteriores realizados para outras espécies de tilápia (Tabela 3).

Quando analisado o efeito da temperatura e da dexametasona (Exp.II.1; Exp.II.2; Exp.II.3) a percentagem de machos é significativamente superior a 36°C com dexametasona, o que não está de acordo com os resultados esperados. No entanto, estes resultados não são conclusivos, uma vez que um elevado número de peixes não sobreviveu ao tratamento com altas temperaturas (Tabela 3).

O desenvolvimento dos peixes à temperatura de 26°C é significativamente superior ao desenvolvimento dos peixes sujeitos a elevadas temperaturas (36°C) (tabela 4). O decréscimo verificado no crescimento a elevadas temperaturas é, possivelmente, devido ao aumento do metabolismo. A elevada mortalidade verificada a 36°C com tratamento de etanol permitiu o crescimento dos peixes a uma baixa densidade o que, possivelmente, influenciou a sua taxa de crescimento (Tabela 4).

Tabela 3 -- Efeito da temperatura (26°C e 36°C) e da temperatura e dexametasona na proporção dos sexos (percentagem de machos), em tilápia de Moçambique. A temperatura elevada contribuiu para a masculinização das gónadas da tilápia, mas a administração da dexametasona não contribuiu para a feminização das gónadas.

	Tratamento	Sexo da gónada		n. id.	total	% Machos
		Feminino	Masculino			
Exp. I	26° C	24	17	35	76	22,4
	36° C	19	42	11	72	58,3
Exp. II.1	26° C	35	20		55	36,4
	36° C ET.					
	36° C DEX.	4	8		12	66,7
Exp. II.2	26° C	42	17		59	28,8
	36° C ET.		3		3	100
	36° C DEX.	5	35		40	87,5
Exp. II.3	26° C	76	19		95	20
	36° C ET.	1	4		5	80
	36° C DEX.	23	14		37	37,8
TOTAL	26° C	177	73	35	285	25,6
	36° C ET.	20	49		78	62,8
	36° C DEX.	32	57		89	64,0

Nota: n. id. = não identificado; ET. – etanol; DEX – dexametasona

Tabela 4- Influência da temperatura (26°C e 36°C) e da temperatura e dexametasona no desenvolvimento da tilápia de Moçambique (média \pm erro padrão). A temperatura e a dexametasona provocaram uma significativa perda de peso e de comprimento nos peixes.

	Tratamento	Peso (mg)	Comp.(mm)
Exp. I	26° C	0,219 \pm 0,006	2,662 \pm 0,248
	36° C	0,102 \pm 0,015	1,690 \pm 0,019
Exp. II.1	26° C	0,527 \pm 0,019	3,180 \pm 0,037
	36° C DEX.	0,356 \pm 0,028	3,092 \pm 0,084
Exp. II.2	26° C	0,230 \pm 0,004	2,456 \pm 0,018
	36° C ET.	0,799 \pm 0,223	3,633 \pm 0,338
	36° C DEX.	0,105 \pm 0,005	1,93 \pm 0,039
Exp. II.3	26° C	0,180 \pm 0,006	2,141 \pm 0,020
	36° C ET.	0,231 \pm 0,108	2,120 \pm 0,424
	36° C DEX.	0,151 \pm 0,011	2,195 \pm 0,046

Nota: ET. – etanol; DEX – dexametasona

3 – Efeito da ACTH e da temperatura na produção de androgénios e de cortisol *in vitro* pela interrenal

Embora se tivesse tentado utilizar a mesma quantidade de tecido nas várias incubações verificou-se que em média os tecidos utilizados a 36°C foram cerca de 35% mais pesados do que os utilizados a 26°C ($p < 0.05$, Tabela 5).

Tabela 5 – Peso (média \pm erro padrão) dos fragmentos de tecido de interrenal utilizados nas incubações.

Temperatura de incubação	
26°C	36°C
8.852 \pm 0.506	11.129 \pm 0.569

Não houve uma relação de dose-resposta significativa na produção de 11-cetotestosterona pela interrenal em resposta a ACTH ($p > 0.05$, Figura 5). No entanto a produção basal da hormona foi significativamente superior a 36°C ($p < 0.05$, Tabela 6).

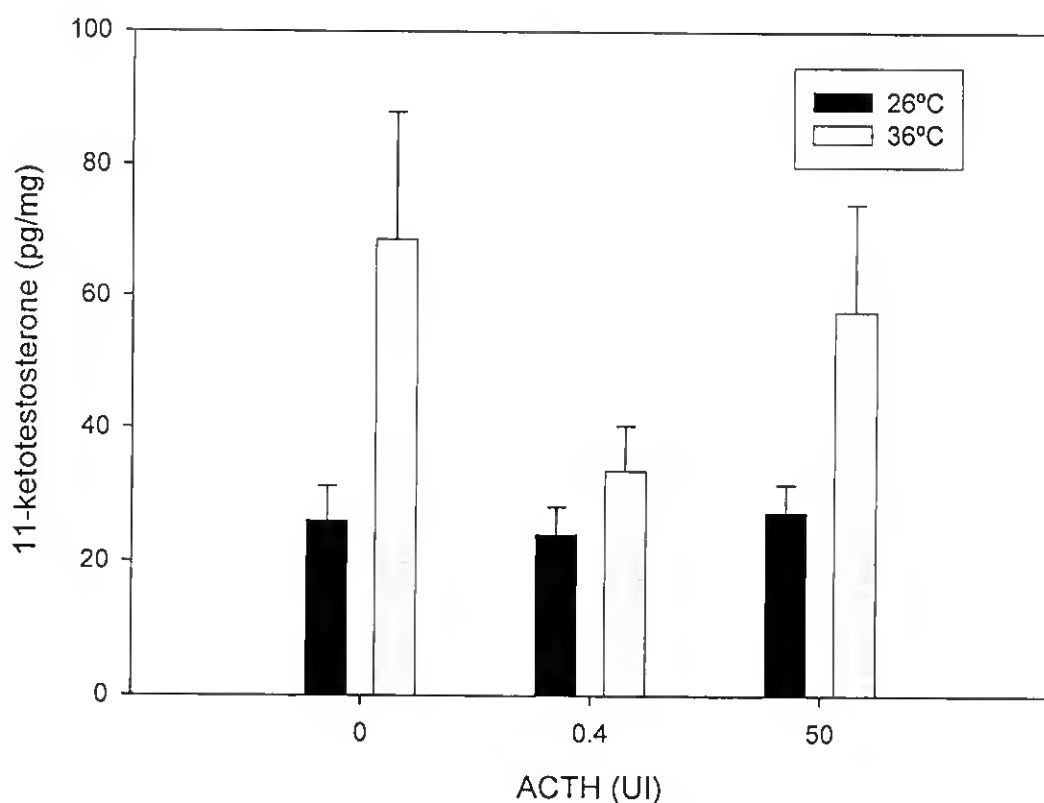


Figura 5 - Efeito da temperatura e dose de ACTH nos níveis de 11-cetotestosterona. Não existe uma dose resposta significativa em resposta a ACTH, mas a produção basal de 11-cetotestosterona é significativamente superior a 36°C ($p < 0.05$).

Tabela 6 – Resultados da análise de variância a duas entradas do efeito da temperatura e dose de ACTH na produção de 11-cetotestosterona pela interrenal (df, graus de liberdade).

Fonte de Variação	Soma de quadrados	df	Quadrados médios	Razão F	P
Temperatura	19087,203	1	19087,203	10,013	0,002
DOSE de ACTH	6272,516	2	3136,258	1,645	0,198
Temp*DOSE de ACTH	4708,503	2	2354,252	1,235	0,295
Erro	183007,954	96	1906,333		

Não houve uma relação de dose-resposta significativa na produção de testosterona pela interrenal em resposta à ACTH ($p > 0.05$, Figura 6), nem houve diferença na produção basal de testosterona às duas temperaturas testadas ($p > 0.05$, Tabela 7).

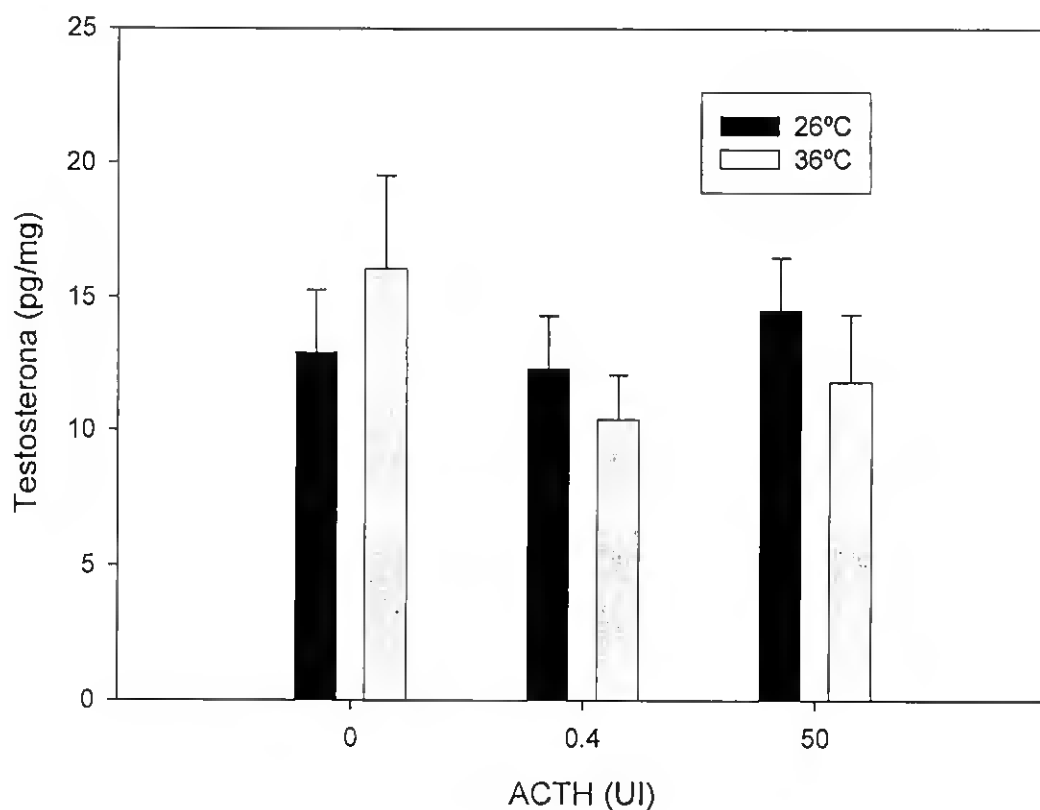


Figura 6 - Efeito da temperatura e dose de ACTH nos níveis de testosterona. Não existe uma dose resposta significativa em resposta a ACTH, nem diferenças na produção basal de testosterona a 26°C e 36°C.

Tabela 7 – Resultados da análise de variância a duas entradas do efeito da temperatura e dose de ACTH na produção de testosterona pela interrenal (df, graus de liberdade).

Fonte de Variação	Soma de quadrados	df	Quadrados médios	Razão F	P
Temperatura	6,536	1	6,536	0,069	0,794
DOSE de ACTH	167,320	2	83,660	0,879	0,418
Temp*DOSE de ACTH	169,913	2	84,957	0,893	0,413
Erro	9135,537	96	95,162		

Houve um aumento muito significativo (3-5 vezes comparativamente com o controlo) na produção de cortisol pela interrenal em resposta a estimulação com 0.4 e 50 UI ACTH ($p < 0.05$, Figura 7). No entanto, a temperatura não influenciou significativamente a produção da hormona ($p > 0.05$, Tabela 8).

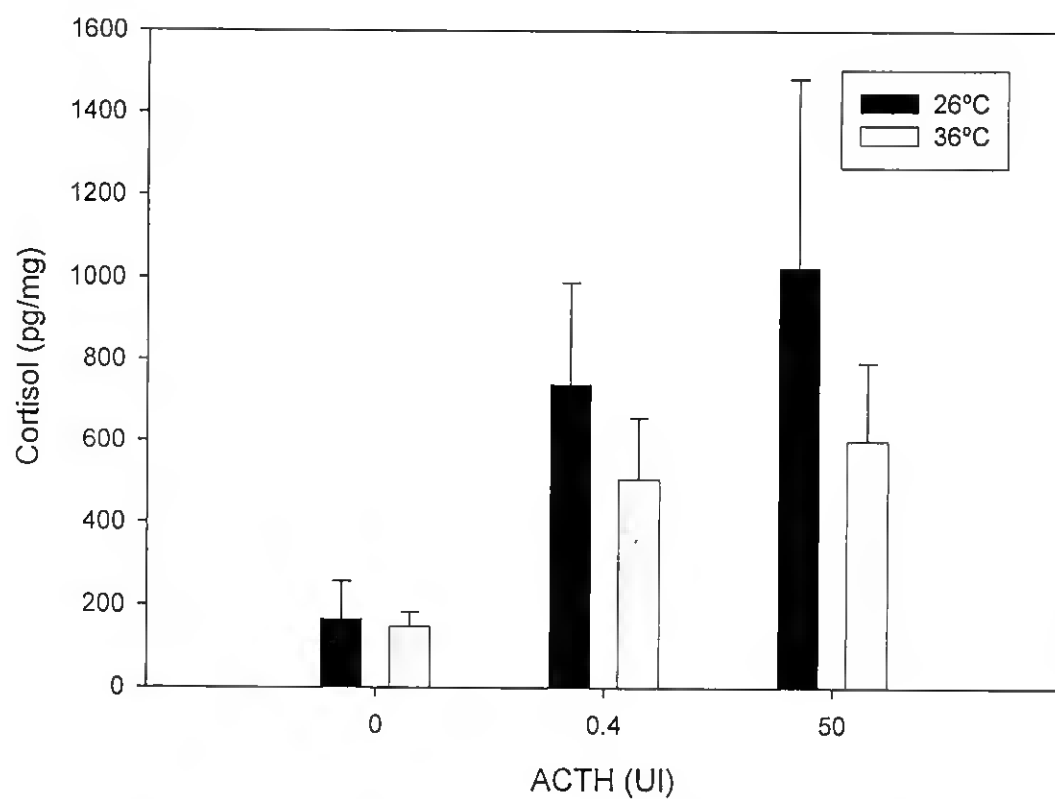


Figura 7 - Efeito da temperatura e dose de ACTH nos níveis de cortisol. Houve uma dose resposta significativa na produção de cortisol por estimulação com ACTH, mas não houve efeito significativo da temperatura.

Tabela 8 – Resultados da análise de variância a duas entradas do efeito da temperatura e dose de ACTH na produção de cortisol pela interrenal (df, graus de liberdade).

Fonte de variação	Soma de quadrados	df	Quadrados médios	Razão F	P
Temperatura	1297667,037	1	1297667,037	1,244	0,268
DOSE de ACTH	7734680,040	2	3867340,020	3,706	0,028
Temperatura*DOSE de ACTH	705011,235	2	352505,617	0,338	0,714
Erro	1,00173E+08	96	1043468,913		

4 – Efeito da temperatura na esteroidogénese da interrenal usando precursores radioactivos

No conjunto de 3 incubações independentes da interrenal com 17-hidroxiprogesterona como precursor a 26 e 36°C, foram obtidos um total de 14 picos que se puderam separar em TLC. Esses picos foram submetidos a uma reacção de bismutato indicadora da presença de uma cadeia lateral no esteróide, assumindo-se que os que não reagiam seriam androgénios. Nalguns casos a reacção foi repetida para confirmação. Só três dos produtos (A, C, E) tiveram uma reacção clara indicando tratar-se de androgénios. Um dos androgénios (C) foi produzido em maiores quantidades a 26°C ao fim de duas horas mas não a quatro horas e outro (E) no mesmo período foi mais abundante a 36°C. O produto G foi sempre mais abundante a 26°C (Tabela 9).

Tabela 9 – Análise comparativa do efeito da temperatura na esteroidogénese da interrenal a 26°C e a 36°C. As três incubações independentes (amostra 1-3) foram realizadas em 3 indivíduos, tendo os produtos isolados sido denominados os isopolares em cromatografia de camada fina com a mesma letra (Pico). Foram então submetidos a reacção de bismutato para avaliar da natureza androgénica.

Pico	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Reacção Bismutato	2 horas	4 horas
A	R	R	?	R	n.s	n.s
B	P	P	?	?	n s	n.s
C	R	?	?	R	P=0,014(36°<26°)	n.s
D	N	?	?	N / ?	n.s	n.s
E	R	R	?	R	P=0,002(36°>26°)	n.s
F	P	P	N	N / ?	n.s	n.s
G	R / ?	?	?	N / ?	P=0,027(36°<26°)	P=0,037(36°<26°)
H	0	N	0	N	n.s	n.s
I	?	?	N	N / ?	n.s	n.s
K	N	?	N	N / ?	n.s	n.s
L	0	P	0		n.s	n.s
M	P	P	R	N / R	P=0,052(36°<26°)	n.s
N	N	? / P	P		n.s	P=0,005(36°>26°)
P	0	?	0		n.s	

Nota: R=reagiu; P=pouco material; N=não reagiu; ?=dúvida; n.s. = não significativo

Da análise grosseira dos metabolitos produzidos pela interrenal a 26°C e a 36°C a partir de [³H]17-hidroxiprogesterona verificou-se que na maior parte dos casos a

temperatura não alterou o padrão esteroidogénico ao fim de 2 ou 4 horas. O metabolito G foi sempre produzido em menor proporção a 36°C, quer às 2 e às 4 horas de incubação. Ao fim de 2 horas, o metabolito C também foi produzido em menor proporção a 36°C, enquanto que os metabolitos E e N foram produzidos em maior proporção a 36° ao fim de 2 e 4 horas respectivamente (Tabela 9). Destes metabolitos só os G e N parecem ser androgénios, pois não reagiram com o bismutato de sódio. No entanto, a pequena quantidade de metabolitos dificultou a confirmação das reacções.

Foram analisados em maior detalhe os seis produtos mais abundantes. Estes foram tentativamente identificados como 5 α -androstane-3,11,17-triona; 5 β -androstane-3,11,17-triona; 5 α -androstane-3,17-diona; 5 β -androstane-3,17-diona; 4-androstene-3,17-diona e 17,20 α -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (Tabela 10).

Tabela 10 – Identificação de esteróides sintetizados *in vitro* pela interrenal de tilápia de Moçambique usando [³H]17-hidroxiprogesterona como precursor radioactivo. No meio de incubação foram detectados androgénios e progestagénios.

Metabolito	TLC	Reacção com trióxido de crómio
5 α - androstane-3,11,17-triona	IV	√
5 β -androstane-3,11,17-triona	IV	√
5 α -androstane-3,17-diona	IV	√
5 β -androstane-3,17-diona	IV	√
4-androstene-3,17-diona	IV	√
17,20 α -dihidroxi-4-pregnen-3-ona	II	----

IV – DISCUSSÃO

Vários estádios do desenvolvimento da gónada têm sido descritos em tilápias. Eckstein e Spira (1965) em estudos histológicos de *Tilápia aurea* mostraram que um primórdio da gónada era distinguível aos dez-onze dias após a eclosão, enquanto que Dutta (1979) observou a diferenciação do ovário aos catorze-quinze dias e a diferenciação do testículo aos dezanove-vinte dias na mesma espécie. Além disso, Chmievsky e Ivoilov (1997) encontraram divisões mitóticas das células germinais primordiais aos dez-doze dias após a fertilização em *Oreochromis mossambicus*. Nakamura e Nagahama (1985) e Nakamura et al. (1993) mostraram que os testículos e ovários eram distinguíveis aos vinte seis-vinte e nove dias após a fertilização em tilápia do Nilo. Fitzpatrick et al (1999) e Baroiller et al. (1995a) em estudos de inversão do sexo, sugeriram que aos onze-doze dias após a fertilização é o período sensível aos esteróides na diferenciação da gónada em tilápia do Nilo.

Os nossos resultados mostram que temperaturas elevadas (36°C) parecem induzir um aumento da percentagem de machos, comparando com o controlo (26°C). Estes resultados indicam que a temperatura influencia a diferenciação do sexo da gónada (durante um período restrito do desenvolvimento). Baroiller et al., 1995, demonstraram também que, em *O. niloticus* mantida a elevadas temperaturas (36°C) dos nove aos treze dias após a fertilização, e durante dez dias ou mais, ocorre uma elevada percentagem de machos. Resultados semelhantes foram demonstrados na tilápia azul em que, a exposição a elevadas temperaturas (34°C) durante vinte e cinco dias induz uma alta percentagem de machos, enquanto que a baixas temperaturas (21°C) durante quarenta dias não tem efeito no rácio dos sexos mas, retarda o desenvolvimento da gónada (Desprez e Melard, 1998). O mesmo foi observado em *Menidia menidia* em que o rácio dos sexos é sensível à temperatura só durante um estágio específico do

desenvolvimento, em que altas temperaturas induzem altas percentagens de machos (Conover e Kynard, 1981).

Yamamoto (1969) sugeriu que os esteróides e os metabolitos dos esteróides participam na cascata da diferenciação do sexo nos teleósteos. Assim, os androgénios e os estrogénios estão envolvidos na diferenciação do sexo e altos níveis destas hormonas podem afectar o sexo fenotípico. Além disso, Bogart (1987) sugeriu que o sexo da gónada é determinado pelo rácio androgénio/estrogénio com relativamente altos ou baixos rácios direccionando o desenvolvimento dos testículos ou dos ovários, respectivamente. Estas teorias assumem a presença destes esteróides antes e/ou durante a diferenciação da gónada. Alterações nos níveis de esteróides durante o desenvolvimento dos peixes, antes de evidências histológicas da diferenciação da gónada, indicam um possível papel dos esteróides na diferenciação do sexo (Feist et al., 1990; Yeoh et al., 1996a).

Em diferentes espécies de tilápia Rothbard et al. (1987) mostraram alterações nos níveis de esteróides sexuais antes, durante e depois do período da diferenciação do sexo. Especificamente, em tilápia do Nilo ocorrem diferenças na actividade das enzimas metabólicas dos esteróides (Baroiller et al., 1986) e nos níveis de esteróides sexuais endógenos (Nakamura e Nagahama, 1989) durante e após a diferenciação da gónada. Histologicamente, as células produtoras de esteróides não são evidentes antes da diferenciação dos testículos (Nakamura e Nagahama, 1989) ou do ovário (Nakamura e Nagahama, 1985), sugerindo que os esteróides sexuais não estão envolvidos na diferenciação (inicial) da gónada. No entanto, a administração de androgénios (MacIntosh et al., 1985; Torrains et al., 1988, Guerrero e Guerrero 1993) ou estrogénios (Yoshkawa e Oguri, 1978; Jensen e Shelton, 1979; Hopkins et al., 1979; Pandian e Sheela, 1995) antes do período da diferenciação da gónada, pode produzir desvios

significativos na razão dos sexos, indicando que os esteróides sexuais estão envolvidos na diferenciação da gónada. Hines et al (1999) demonstraram em tilápia do Nilo alterações nos níveis de esteróides sexuais e na actividade metabólica dos esteróides antes, durante e depois de evidências histológicas da diferenciação da gónada.

No nosso estudo, não se observou um pico significativo nos níveis dos esteróides 11-KT e 17 β -estradiol, embora os níveis mais elevados fossem aos 12 dias após a fertilização. Hines et al.(1999) mostraram que os esteróides sexuais estão presentes em ovos, embriões e larvas, mas as concentrações decrescem acentuadamente dentro das primeiras duas semanas. O declínio inicial dos esteróides, está de acordo com estudos realizados em *Oreochromis niloticus* (Rothbard et al., 1987) e salmonídeos (Feist et al., 1990; de Jesus e Hirano, 1992; Yeoh et al., 1996a). Rothbard et al. (1987) demonstraram que os esteróides presentes inicialmente no embrião são de origem maternal. Feist et al.(1990) e Yeoh et al. (1996a) sugeriram que o decréscimo nos níveis de esteróides endógenos durante o desenvolvimento representa o processo inicial do metabolismo dos esteróides maternos pelos embriões com subsequente síntese de esteróides endógenos. Neste estudo, os níveis de androgénios e estrogénios, para as duas temperaturas (26°C e 36°C) são muito baixos a partir dos 15 dias após a fertilização, verificando-se um aumento transitório nos níveis de 11-KT aos 22 dias após a fertilização, enquanto que os níveis de 17 β -estradiol (E2) permanecem praticamente indetectáveis. Estes resultados estão de acordo com resultados obtidos em *Oreochromis niloticus* (Hines et al., 1999).

Parece haver alguma influência da temperatura (36°C) na razão entre os níveis das duas hormonas (11-KT/E2), sendo mais elevados aos 17 e 27 dias após a fertilização, embora com muita variabilidade. Assim, podemos considerar que os níveis de KT apresentam uma distribuição bimodal. Rothbard et al. (1987) sugeriram que a

bimodalidade dos níveis de esteróides em *O. niloticus* representam dois subgrupos de machos e fêmeas. Do mesmo modo, populações de tilápia de Moçambique exibem dois subgrupos baseados nos relativamente altos ou baixos níveis de androgénios (Chan e Yeung, 1986). O subgrupo com altos níveis de androgénios foi sugerido representar machos genéticos enquanto que, o subgrupo com baixos níveis de androgénios foi sugerido representar a inversão do sexo em fêmeas genéticas. No entanto, no nosso estudo não parece haver diferença no padrão de 11-KT e E₂ entre si e às duas temperaturas, pelo que o conteúdo hormonal total das larvas pode não ser um bom indicador da diferenciação sexual.

Muitos estudos realizados em répteis, permitiram concluir que a temperatura exerce a sua acção nas vias metabólicas que conduzem à síntese (final) dos esteróides sexuais (Crews e Bergeron, 1994; Pieau et al., 1994a). É geralmente aceite que, a temperatura regula a produção de androgénios e estrogénios que são, por sua vez, responsáveis pelo desenvolvimento dos testículos e ovário, respectivamente (Pieau et al., 1994; Wibbels et al., 1994). A expressão do gene da enzima aromatase é activada a temperaturas indutoras de fêmeas e inibido a temperaturas indutoras de machos. No entanto, para induzir características do desenvolvimento testicular é também necessário a presença de um estímulo androgénico. A importância da aromatase para o desenvolvimento do ovário parece ser o ponto chave em todos os estudos realizados. Neste contexto, os inibidores da aromatase têm mostrado interromper o desenvolvimento do ovário em peixes (Piferrer et al., 1994); répteis (Lance e Bogart, 1992; Desvages et al., 1993; Dorizzi et al., 1994; Jeyasuria et al., 1994; Pieau et al., 1994b), anfíbios (Yu et al., 1993) e aves (Elbrecht e Smith, 1992). Assim, altas temperaturas durante o período crítico podem modificar a actividade das enzimas envolvidas na síntese dos esteróides sexuais (neste caso o gene 5 α -redutase) e/ou nos seus receptores, bem como as ligações dos

esteróides sexuais aos seus receptores, tal como sugerido por Lester et al. (1989). Os peixes apresentam particularidades nos seus modelos de determinismo do sexo dependente da temperatura (TSD), dado que populações monosexo não são geralmente produzidas a temperaturas extremas, sugerindo a existência de fortes interacções entre a temperatura e o genótipo na manifestação do sexo fenotípico. Vários estudos demonstraram estas interacções, como por exemplo, em *Dicentrarchus labrax* (Conover e Heins, 1987, Lagomasino e Conover, 1993), *Poeciliopsis lucida* (Sullivan e Schulz, 1986), *Oreochromis niloticus* (Baroiller et al., 1995a; Baroiller e Clota, 1997), *Ictalurus punctatus* (Patino et al., 1996), *Odontheistes argentinensis* (Strussmann et al., 1996a) e *Odontheistes bonariensis* (Strussmann et al., 1996b).

Muitos estudos têm demonstrado que a administração de hormonas (naturais e sintéticas) podem modificar a actividade do eixo HPI. Assim, a dexametasona, um glucocorticóide sintético, mostrou ser efectivo em suprimir o eixo HPI, tanto em mamíferos (Forest e David, 1992; Brody et al., 1994) como em peixes (Pickering et al., 1987; Lee et al., 1992; Pottinger et al., 2000). Em muitas espécies de peixes, os embriões e as larvas têm a capacidade de sintetizar e metabolizar cortisol (Barry et al., 1995), e o eixo HPI pode ser activado em resposta ao stress (Stoutbart et al., 1998). Assumindo que o cortisol/stress aumenta o nível de androgénios em tilápia de Moçambique ao ser bloqueada ou reduzida a síntese de cortisol esperar-se-ia a diminuição do nível de androgénios plasmáticos (provenientes da interrenal) e, assim, a inversão da razão dos sexos a favor das fêmeas. Contudo, neste estudo, a administração da dexametasona não pareceu afectar significativamente a razão dos sexos. No entanto, estes resultados poderão também ser devidos à mortalidade selectiva, dado que só um limitado número de peixes sobreviveu ao tratamento. Apesar do alto índice de mortalidade é de referir que no final da experiência os peixes sujeitos ao tratamento

(dexametasona) apresentam uma tendência de desvio da razão dos sexos a favor dos machos (64%), o que não está de acordo com a maioria dos resultados obtidos em outros estudos. Diferentes espécies apontam para um diferente envolvimento da dexametasona na actividade testicular. Em vários vertebrados, como por exemplo em répteis e mamíferos, a adrenalectomia provoca uma nítida supressão da actividade esteroidogénica dos testículos. No entanto, a administração da dexametasona resulta na normalização da actividade testicular (Yajurvedi e Chandranoham, 1994). Contudo, a dexametasona tem mostrado inibir a esteroidogénese testicular em ratos quando administrada em altas doses e por longos períodos (Gow et al., 2001). Este estudo, no entanto sugere um papel dos corticosteróides no crescimento, já que a dexametasona provocou uma significativa perda de peso e de comprimento relativamente aos peixes do grupo controlo. Estes resultados estão de acordo com vários estudos em humanos (Brody et al., 1994) como em várias espécies de peixes, como por exemplo em *Fundulus heteroclitus* (Pickford et al., 1970), *Ictalurus punctatus* (Davis et al., 1985) e *Onchonrynechus mykiss* (Barton et al., 1987) e *Poecilia latipinna* (Van der Boon et al., 1991), em que o tratamento com corticosteróides provocou um decréscimo no peso e comprimento quando administrados em altas doses e por longos períodos. De facto, os glucocorticóides têm mostrado afectar o metabolismo das proteínas, carboidratos e lípidos (Van der Boon et al., 1991) e, também, estarem directamente envolvidos na regulação da transcrição do gene da hormona de crescimento (GH) em humanos e ratos (Brody et al., 1994; Jux et al., 1998; Giustina e Veldhuis, 1998) e no receptor da hormona de crescimento (GHR) nos peixes (Bernardini et al., 1999).

A temperatura também influenciou o desenvolvimento dos peixes o que estará relacionado com o normal aumento do metabolismo com a temperatura.

Muitos factores podem modificar a resposta da pituitária-interrenal a estímulos de stress nos peixes, tais como temperatura da água (Sumpter et al., 1985), qualidade da água (Pickering e Pottinger, 1987), esforço dos peixes (Pottinger e Moran, 1993) variações individuais (Pottinger et al., 1992a) e repetição do estímulo (Barton et al., 1986). Observações anteriores evidenciam que nos salmonídeos a resposta ao stress pelos corticosteróides é também afectada pela maturidade sexual (Fagerlund e Donaldson, 1969; Fagerlund, 1970; Donaldson e Fagerlund, 1970, 1972; Sumpter et al., 1987; Pottinger et al., 1995). Em truta arco-íris, machos adultos exibem reduzidos níveis de cortisol em resposta ao stress comparativamente com peixes imaturos de ambos os sexos. Esta reduzida resposta do cortisol ao stress parece ser mediada principalmente por uma redução na produção de ACTH pela pituitária (Pottinger et al., 1995), embora outros factores, como por exemplo alterações na sensibilidade do tecido da interrenal à ACTH não possam ser ignoradas. Existem evidências de que a testosterona e a 11-KT podem suprimir a actividade da interrenal na truta (Young et al., 1996 e Pottinger et al., 1995, 1996), tendo sido sugerido que a reduzida resposta do cortisol ao stress crónico observada em peixes adultos é devida ao elevado nível de androgénios durante a maturação sexual (Pottinger et al., 1996). Os mamíferos, também apresentam diferentes reacções ao stress relacionadas com o sexo (Aloisi et al., 1994; Heuser et al., 1994; Spinedi et al., 1994), e uma reduzida sensibilidade do eixo pituitária-adrenal poderá estar ligada ao elevado nível de androgénios (Boissy e Bouissou, 1994; Bingaman et al., 1995), enquanto que, o aumento da sensibilidade do eixo HPA estará ligado ao estrogénio das fêmeas (Burgess e Handa, 1992). No nosso estudo, a produção de androgénios (testosterona e 11-KT) pela interrenal apresenta níveis inferiores aos de cortisol, na ausência de ACTH, verificando-se, no entanto, que a produção basal de 11-KT é significativamente superior a 36°C. Esta reduzida resposta

da interrenal ao stress poderá ser devida, possivelmente, aos elevados níveis de androgénios (testosterona e 11-cetotestosterona). Os nossos resultados mostram que, apesar do aumento muito significativo na produção de cortisol pela interrenal, em resposta à estimulação com ACTH, de modo dependente da dose, não foram observadas alterações significativas na produção de testosterona e 11-KT. Assim, tendo em conta estes resultados, parece não haver uma correlação entre o cortisol e os androgénios, testosterona e 11-KT.

Os resultados das incubações de [³H] 17-hidroxiprogesterona com tecido da interrenal de tilápia de Moçambique indicam que a temperatura pode ter um efeito directo na esteroidogénese da interrenal, actuando nas enzimas esteroidogénicas, e mostram que os esteróides formados a partir de 17-hidroxiprogesterona variam em função da temperatura. Neste estudo, os esteróides produzidos às duas temperaturas (26°C e 36°C), de três incubações independentes da interrenal foram androgénios e progestagénios. Foi demonstrado que androstenediona é o androgénio predominante produzido pela adrenal do porco da Índia (Hyatt et al., 1983; Belanger et al., 1990), peixe gato, *Clarias gariepinus* (Vermeulen et al., 1995) salmão, *Oncorhynchus kisutch* (Schreck et al., 1989) e tilápia de Moçambique (Balm et al. 1989).

A produção dos androgénios 5 α e 5 β reduzidos indicam a existência das enzimas 5 α -redutase e 5 β -redutase e pode representar uma via de inactivação para prevenir a acumulação de elevados níveis de androgénios biologicamente activos que poderão interferir com determinados aspectos da fisiologia da interrenal. Contudo, o papel dos esteróides 5-reduzidos não está claramente definido. Nos peixes, foi sugerido que os esteróides 5-reduzidos actuam como um tampão biológico, promovendo a síntese de produtos biologicamente inactivos (Kime e Hyder, 1983) ou de produtos não aromatizáveis (Querat et al., 1986). Neste estudo, o metabolismo total de 17-

hidroxiprogesterona (precursor exógeno radioactivo) é maior a 26°C, o que parece resultar num aumento de esteróides 5(α , β) reduzidos. Nos mamíferos e teleósteos, foi demonstrado que o tecido da interrenal é a principal fonte não só de corticosteróides mas também de progestagénios e androgénios (Hyatt et al., 1983; Canonaco et al., 1989; Schreck et al., 1989; Belanger et al., 1989, 1990, 1992). Nos mamíferos, os esteróides 5 β -reduzidos são formados predominantemente pelo fígado e são geralmente considerados como catabolitos inactivos, embora haja algumas indicações de que podem estimular a síntese de hemoglobina (Leveré et al., 1967; Mizoguchi e Leveré, 1971). Guiguen et al (1995), mostraram que 5 β -reductase está presente no ovário, testículos e gónadas de transição de robalo protândrico, *Lates calcarifer*.

A produção do progestagénio 17,20 α -P, a partir do precursor exógeno radioactivo 17-hidroxiprogesterona, mostra a presença da enzima 20 α -hidroxiesteróide desidrogenase (20 α -HSD). 20 α -HSD pode, também, estar envolvida no controlo da produção de androgénios competindo com C₁₇₋₂₀ desmolase, para o substrato 17-hidroxiprogesterona, na produção de androstenediona. 17,20 α -P é, também, produzido pelo esperma de vários teleósteos, como por exemplo, *Limanda limanda* (Canário e Scott, 1989b), *Ciprinus carpio* (Asahina et al., 1990), *Epinephelus coioides* (Lee et al., 1998) e *Platichthys flesus* (Asahina et al., 1994), mas a sua função não foi clarificada.

Em conclusão, embora se tenha confirmado que a temperatura elevada contribui para a masculinização das gónadas da tilápia de Moçambique, a hipótese de a interrenal ser mediadora deste processo através da produção de um excesso de androgénios não parece confirmar-se. Parece assim mais provável que, tal como nalguns répteis, ser ao nível da própria gónada em formação que a temperatura influencia a actividade esteroidogénica. Esta conclusão vai ao encontro das descobertas de D'Cotta et al.(1999)

que determinaram que a temperatura inibia a expressão genética de aromatase na gónada levando à masculinização.

REFERÊNCIAS:

- Allanson, B. R. e Noble, R. G. (1964). The tolerance of *Tilapia mossambica* (Peters) to high temperatures. *Trans. Amer. Fish. Soc.* **93**, 323-332.
- Allanson, B. R ; Bok, A. e van Wyk, N. I. (1971). The influences of exposure to low temperature on *Tilapia mossambica* Peters (Cichlidae). II. Changes in serum osmolarity, sodium and chloride concentrations. *J. Fish. Biol.* **3**, 181-185.
- Aloisi, A. M., Steenbergen, H. L., van de Poll, N. E., and Farabollini, F. (1974). Sex-dependent effects of restraint on nociception and pituitary-adrenal hormones in the rat. *Physiol. Behav.* **55**: 789-793.
- Antila, E. (1984). Steroid conversion by oocytes and early embryos of *Salmo gairdeneri*. *Ann. Zool. Fennici.* **21**: 465-471.
- Arai R, Tajima H, Tamaoki B. (1969). In vitro transformation of steroids by the head kidney, and the corpuscles of Stannius of the rainbow trout (*Salmo gairderi*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **12**: 99-109.
- Asahina, K., Barry, T. P., Aida, K., Fusetani, N., and Hanyu, I. (1990). Biosynthesis of 17 α ,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one from 17 α -hydroxyprogesterone by spermatozoa of the common carp, *Cyprinus carpio*. *J. Exp. Zool.* **255**: 244-249.
- Asahina, K., Lambert, J. G. D., and Goos, H. J. T. (1994). Bioconversion of 17 α -hydroxyprogesterone into 17 α ,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one and 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one by flounder (*Platichthys flesus*) spermatozoa. *Zool. Sci.* **11**: 859-863.
- Atz, J. W. (1964). Intersexuality in fishes. In: Intersexuality in Vertebrates Including Man. C. N. Armstrong and A. J. Marshall, eds. Academic Press, London, pp. 145-232.

- Balm PHM, Lambert JGD, Wendelaar Bonga SE (1989) Corticosteroid biosynthesis in the interrenal cells of the teleost fish, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **76**: 53-62.
- Bara G. (1968) Histochemical study of 3β - 3α -, 11β -, and 17β -hydroxysteroid deshydrogenases in the adrenocortical tissue and the corpuscles of Stannius of *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **10**: 126-137.
- Bardach, J. E., Ryther, J. H., McLarney, W. O. (1972) Aquaculture, The farm and husbandry of freshwater and marine organisms. Wiley Interscience. New York, USA.
- Barlow, G. W. (1974). Hexagonal territories. *Anim. Behav.* **22**: 876-878.
- Baroiller, J.F., Fostier A., and Jalabert B. (1986). Precocious steroidogenesis in the gonads of *Oreochromis niloticus*, during and after sexual differentiation. In "Reproduction in fish. Basic and applied aspects in endocrinology and genetics". Vol. 44, pp. 137-141. Les colloques de l'INRA, Paris.
- Baroiller, J.F.; D. Chourrout, A. Fostier and B. Jalabert (1995a). Temperature and sex chromosomes govern sex-ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.*, **273**:216-223.
- Baroiller, J.F., F. Clota, and E. Geraz (1995b). Temperature sex determination in two tilapia *Oreochromis niloticus* and the red tilapia (red Florida strain): effect of high or low temperature. In: Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. F. W. Goetz and P. Thomas, eds. Fish Symp. 1995, Austin, Texas, pp. 158-160.

- Baroiller, J.F. and F. Clota (1997). Interactions between temperature effects and genotype on *Oreochromis niloticus* sex determination. In: Proceedings of the First International Symposium of the Biology of Vertebrate Sex Determination. V. A. Lance and M. H. Bogart, eds. Honolulu, Hawaii, p.8.
- Baroiller, J.F.; Guigen, Y.; Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 910-931.
- Baroiller, J.F. and D'Cotta H. (2001). Environment and sex determination in farmed fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **130C**: 399-409.
- Barry, T. P., Malison, J. A., Held, J. A., and Parrish, J. J. (1995). Ontogeny of the cortisol stress response in larval rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **97**, 57-65.
- Barton, B. A., Schreck, C. B., and Sigismondi, L. A. (1986). Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile chinook salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* **115**: 245-251.
- Barton, B. A., Schreck, C. B., and Barton L. D. (1987). Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions and stress responses in juvenile rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.* **2**, 173-186.
- Barton, B. A., and Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish. Dis.* **1**: 3-26.
- Baulieu, E;E., and Kelly, P. A. (1990). Hormones. From molecules to disease. Chapman and Hall, New York and London.
- Beaven, D. W., Espiner, E. A., and Hart, D. S. (1964). The suppression of the cortisol secretion by steroids and response to corticotrophin in sheep with adrenal transplants. *J. Physiol. (London)*. **171**: 216-230.

- Bélanger B., Bélanger A., Labrie F., Dupont A., Cusan J., and Monfete G. (1989). Comparison of residual C-19 steroids in plasma and prostatic tissue of human, rat and guinea pig after castration: unique importance extratesticular androgens in men. *J. Steroid Biochem.* **32**: 695-698.
- Bélanger B., Couture J., Caron S., Bodou P., Fiet J. and Bélanger A. (1990). Production and secretion of C-19 steroids by rat and guinea pig adrenals. *Steroids* **55**: 360-365.
- Bélanger B., Caron S., Bodou P., Fiet J. and Bélanger A. (1992). Adrenal steroidogenesis in the guinea-pig: effects of the androgens. *Steroids* **57**: 76-81.
- Bernardini, S.; Argenton, F.; Vianello, S.; Colombo, L.; Bortolussi, M. (1999). Regulatory regions in the promotor and tirad intron of the growth hormone gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Gen. Comp. Endocrinol.* **116**: 261-271.
- Bhattacharyya T.K. and Butler D.G. (1979). Fine structure of the adrenocortical homologue in the North American eel and modifications following seawater adaptation. *Anat. Rec.* **193**: 213-232.
- Bingaman, E. W., van de Kar, L. D., Yracheta, J. M., Li, Q., and Gray, T. S. (1995). Castration attenuates prolactin response but potentiates ACTH response to conditioned stress in the rat. *Am. J. Physiol.* **269**: R856-R863.
- Bogart MH. (1987). Sex determination: a hypothesis based on steroid ratios. *J. Theor. Biol.* **128**: 349-357.
- Boissy, A., and Bouissou, M. F. (1994). Effects of androgen treatment on behavioural and physiological responses of heifers to feareliciting situations. *Hormones Behav.* **28**: 66-83.

- Bowen, S. H. (1984). Differential habitat utilization by sexes of *Sarotherodon mossambicus* in Lake Valencia, Venezuela: significance for fitness. *J. Fish Biol.* **24**, 115-121.
- Brody, T.M.; Larner, J.; Minneman, K.P.; Neu, H.C. (1994). Human Pharmacology. Molecular to clinical. Second edition. Mosby. 952 p.
- Bull, J.J. (1980). Sex determination in reptiles. *Q. Rev. Biol.* **55**: 3-21.
- Burgess, L. H., and Handa R. J. (1992). Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology* **131**: 1261-1269.
- Burton, A. F. Storr, J. M. , and Dunn, W. L. (1967). Cytolytic action of corticosteroids on thymus and lymphoma cells in vitro. *Can. J. Biochem.* **45**: 289-297.
- Bush, I. E. (1961). "The Chromatography of Steroids" Pergamon Press, Oxford/New York.
- Canário, A. V. M., and Scott, A. P. (1989a). Conjugates of ovarian steroids, including 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (maturation-inducing steroid), accumulate in the urine of a marine teleost (plaice; *Pleuronectes platessa*). *J. Endocrinol.* **127**, R1-R4.
- Canário, A. V. M., and Scott, A. P. (1989b). Synthesis of 20 α -hydroxylated steroids by ovaries of the dab (*Limanda limanda*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **76**, 147-158.
- Canonaco, M. , Ando, S., Valenti, A., Tavoralo, R., Panno, M. L., Maggioline M., Dessi-Fulgheri, F. (1989). The in vitro transformation of [3 H] dehydroepiandrosterone into its principal metabolites in the adrenal cortex of adult castrated male rats and following steroid treatment. *J. Endocrinol.* **121**: 419-424.

- Cavaco, J. E. B., Lambert, J. G. D., Schulz, R. W., and Goos, H. J. T. (1997). Pubertal development of male African catfish, *Clarias gariepinus*. *In vitro* steroidogenesis by testis and interrenal tissue and plasma levels of sexual steroids. *Fish. Physiol. Biochem.* **16**: 129-138.
- Chan, S. T. H., and Yeung, W. S. B. (1986). A new method for the simultaneous determination of androstenedione, testosterone, 11-oxotestosterone and 11 β -OH-testosterone in fish plasma using combined techniques of celite chromatography and radioimmunoassay. *Steroid Biochem.* **25**, 1013-1021.
- Chan, D. K. O. and Woo, N. Y. S. (1978). Effect of cortisol on the metabolism of the eel, *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **35**, 205-215.
- 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**: 100-107.
- Chervinski, J. (1982). Environmental physiologie of tilápias. In: R. S. V. Pullin e R. H. Lowe-McConnell (eds), the Biology and Culture of Tilápias, pp. 119-128. ICLARM, Manila.
- Chmievsky, D. A., and Ivoilov, A. A. (1997). Effect of X-rays on gametogenesis and growth of tilápia (*Oreochromis mossambicus* Peters). In "Tilápia Aquaculture". Proceedings from the 4th International Symposium on Tilápia in Aquaculture (K. Fitzsimmons, ed.), Orlando, FL. pp. 224-229.
- Condeça, J.B.; and Canário, A.V.M. (2001). Gonadal steroidogenesis in response to estradiol-17 β administration in the sea bream (*Sparus aurata* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* **124**: 82-96.

- Conover, D. O., and B. E. Kynard (1981). Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. *Science* **213**: 577-579.
- Conover, D. O. (1984). Adaptive significance of temperature – dependent sex determination in a fish. *Am. Nat.* **133**: 297-313.
- Conover, D. O., and S. W. Heins (1987). The environmental and genetic components of sex ratio in *Menidia menidia* (Pisces: Atherinidae) *Copeia* **3**: 132-143.
- Craig, J.K.; Foote, C.J.; Wood, C.C. (1996) Evidence for temperature-dependent sex determination in sockeye salmon (*Onconrhyinchus nerka*). *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* **53**: 141-147.
- Crews, D. (1996). Temperature-dependent sex determination: the interplay of steroid hormones and temperature. *Zool. Sci.* **13**: 1-13.
- Crews, D., and J. M. Bergeron (1994). Role of reductase and aromatase in sex determination in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. *J. Endocrinol.* **143**: 279-289.
- Davis, K. B. , Torrence, P., Parker, N. C. and Suttle, M. A. (1985). Growth, body composition and hepatic tyrosine aminotransferase activity in cortisol-fed channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Biol.* **27**, 177-184.
- D’Ancona, U. (1959). Distribution of the sexes and environmental influence in the European eel. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* **48** bis: 61-70.
- D’Cotta, H., Guigen, Y., Govoronoun, M., McMeel, O. M., and Baroiller, J. F. (1999). Aromatase gene expression in temperature-induced gonadal sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. In “6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish”, pp.197.

- De Jesus, E. G. T., and Hirano, T. (1992). Changes in whole body concentrations of cortisol, thyroid hormones, and sex steroids during early development of the chum salmon, *Onchorhynchus keta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**: 55-61.
- Degani, G., and D. Kushnirov (1992). Effects of 17 β -estradiol and grouping on sex determination of European eels. *Progr. Fish-Cult.* **54**: 88-91.
- Desprez, D. Melard C. (1998). Effect of ambient water temperature on sex determination in the blue tilapia *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* **162**: 79-84.
- Desvasges, G. M., M. Girondet, and C. Pieau (1993). Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle *Demochelys coriacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **92**: 54-61.
- Dial R. S., and S. C. Wainright. (1983a). New distributional records for non-native fishes in Florida. *Florida Scientist* **46**: 1-8.
- Dial R. S., and S. C. Wainright. (1983b). New distributional records for non-native fishes in Florida. *Florida Scientis.* **46** : 8-15.
- Donaldson, E. M. ;, and McBride, J. R. (1967). The effects of hypophysectomy in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with special reference to the pituitary-interrenal axis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **9**: 93-101.
- Donaldson, E. M., and Fagerlund, U. H. M. (1970). Effect of sexual maturation and gonadectomy at sexual maturity on cortisol secretion rat in sockeye samon (*Oncorhynchus nerka*). *J. Fish. Res. Board. Can.* **27**: 2287-2296.
- Donaldson, E. M., and Fagerlund, U. H. M. (1972). Corticosteroid dynamics in Pacific salmon. *Gen. Comp. Endocrinol. Suppl.* **3**: 254-265.
- Donaldson, E. M., (1981). The pituitary interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: A. D. Pickering (Editor), *Stress and Fish*. Academic Press, pp.11-47.

- Dorizzi, M.; Richard-Mercier, N.; Desvages, G.; Girondot, M.; Pieau, C. (1994). Masculinization of gonads by aromatase inhibitors in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Differentiation* **58**: 1-8.
- Dutta, O. K. (1979). Factors influencing gonadal sex differentiation in *Tilapia aurea*. Thesis, Auburn University.
- Eckstein B., and M. Spira (1965). Effect of sex hormones on gonadal differentiation in a cichlid, *Tilapia aurea*. *Biol. Bull.* **129**: 482-489.
- Elbrecht, A., and R. G. Smith (1992). Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* **255**: 467-470.
- Fagerlund, U. H. M. and Donaldson, E. M. (1969). The effect of androgens on the distribution and secretion of cortisol in gonadectomized male sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **12**: 438-448.
- Fagerlund, U. H. M. (1970). Response to mammalian ACTH of the interrenal tissue of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) at various stages of sexual maturation. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **27**: 1169-1172.
- Feist, G.; Schreck, C. B.; Fitzpatrick, M. S.; Redding, J.M. (1990). Sex steroid profiles of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during early development and sexual differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **80**: 299-313.
- Feist, G. and Schreck, C.B. (1996). Brain-pituitary-gonadal axis during early development and sexual differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **102**: 394-409.
- Fitzpatrick, M. S. (1990). The endocrine regulation of final oocyte maturation and sex differentiation in salmonids. Doctor of Philosophy thesis, Oregon State University.

- Fitzpatrick, M. S. Lucerno, M., Contreras-Sanchez, W., and Schreck, C. (1999). Masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. *Aquaculture*. **178**: 33349-357.
- Fontainhas-Fernandes, A. (2002). Fisiologia da tolerância à água salgada em tilápia: uma revisão. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, **IX**: 29-58.
- Forest, M.G. and David, M. (1992). Prevention of sexual ambiguity in children with 21-hydroxylase deficiency by treatment in utero. *Pediatric*. **47** (5): 351-357.
- Francis, R.C. (1992). Sexual lability in teleosts: developmental factors. *Q. Rev. Biol.* **67**: 1-18.
- Fryer, G. e Iles, T. D. (1972). The Cichlid Fishes of The Great Lakes of Africa – Their Biology and Evolution. Oliver & Boyd, Edimburgh.
- Giustina, A. and Wehrenberg, W. B. (1992). The role of glucocorticoids in the regulation of growth hormone secretion: Mechanisms and clinical significance. *Trends Endocrinol. Metab.* **3**: 306-311.
- Giustina, A. and Veldhuis, J.D. (1998). Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the humans. *Endocrine reviews*. **19** (6): 717-797.
- Gordon, M. (1974). Genetics of *Platypoecilus maculatus*. IV. The sex-determining mechanism in two wild populations of the Mexican platy fish. *Genetics* **32**: 8-17.
- Gow, R.M; O'Bryan, M.K.O.; Canny, B.J.; Ooi, G.T.; Hedger, M.P. (2001). Differential effects of dexamethasone treatment on lipopolysaccharide-induced testicular inflammation and reproductive hormone inhibition in adult rats. *J. Endocrinol.* **168**: 193-201.
- Guerrero, R. D., III., and Guerrero, L. A. (1993). Effect of oral treatment of mibolerone on sex reversal of *Oreochromis mossambicus*. *Asian Fish. Sci.* **6**: 347-350.

- Guigen, Y.; Jalabert, B.; Benett, A.; Fostier, A. (1995). Gonadal *in vitro* androstenedione metabolism and changes in some plasma and gonadal steroid hormones during sex inversion of the protandrous sea bass, *Lates calcarifer*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **100**: 106-118.
- Hansson T. and Gustafsson J. A. (1981). Sex differences in the hepatic *in vitro* metabolism of 4-androsten-3,17-dione in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **44**: 181-188.
- Haqq. C. M., King, C. Y., Donahoe, P. K., and Weiss, M. A. (1993). SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:1097-1101.
- Harrington, R. W. Jr. (1967) Environmentally controlled induction of primary male gonochorists from eggs of the self – fertilizing hermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus* Poey. *Biol. Bull. (Woods Hole)*, **132**: 174-199.
- Hart, P. R., W. G. Hutchinson, and G. J. Purser (1996) Effects of photoperiod, temperature and salinity on hatchery-reared larvae of the greenback flounder (*Rhombosolea tapirina* Günther, 1862). *Aquaculture* **144**: 303-311.
- Henderson IW, and Garland H. O. (1980). The interrenal gland in Pisces. Part 2. Physiology. In: Chester Jones I, Henderson IW (eds) General, comparative and clinical endocrinology of the adrenal cortex. Vol.3, Academic Press, New York, pp. 473-524.
- Heuser, I. J., Gotthardt, U., Schweiger, U., Schmider, J., Lammers, C. H. , Dettling, M., and Holsboer, F. (1994). Age-associated change of pituitary-adrenocortical hormone regulation in humans: importance of gender. *Neurobiol. Aging.* **15**: 227-231.
- Hickling C. F. (1960). The Malaca tilápia hybrids. *J. Genet.* **57**: 1-10.

- 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). *Gen. Comp. Endocrinol.* **114**: 235-248.
- Hopkins, K., Shelton, W. L. and Engle, C. R. (1979). Estrogen sex-reversal of *Tilapia aurea*. *Aquaculture* **18**: 263-268.
- Hyatt P. J., Bell J. B. G., Bhatt K. , Tait J. F. (1983). Preparation and steroidogenic properties of purified zona fasciculata and zona reticularis cells from the guinea-pig adrenal gland. *J. Endocrinol.* **96**: 1-14.
- Idler, D.R. and Truscott, B. (1972). Corticosteroid in fish. *In: Steroids in mammalian vertebrates*. D.R. Idler, Academic press. 504 p.
- Jalabert, B., and Fostier, A. (1984). The follicular sensitivity *in vitro* to maturation-inducing hormones in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: role of oestradiol-17 β . *Aquaculture* **43**, 1-11.
- James, N. P. E. and Bruton, M. N. (1992) Alternative life – history traits associated with reproduction in *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae) in small water bodies of the eastern Cape, South Africa. *Env. Biol. Fish.* **34**, 379-392.
- James, V. H. T., Landon, J., and Fraser, R. (1968). Control of steroid secretion in man. *Mem. Soc. Endocrinol.* **17**, 141-158.
- Jensen, G. L., and Shelton, W. L. (1979). Effects of estrogens on *Tilapia aurea*: Implications for production of monosex genetic male tilapia. *Aquaculture* **16**: 233-242.
- Jeyasuria, P.; W. M. Roosenburg, and A. R. Place (1994). Role of P-450 aromatase in sex determination of the diamondback terrapin, *Malaclemis terrapin*. *J. Exp. Zool.* **270**: 95-111.

- Jeyasuria P, Place AR. (1998). Embryonic brain-gonadal axis in temperature-dependent sex determination of reptiles: a role for P450 aromatase (CYP19). *J. Exp. Zoo.* **281**: 428-449.
- Jung B. , Moritz M. E, Berchtold J. P. (1981). Fine structure and function of interrenal (adrenocortical) cells of dexamethasone treated trout (*Salmo fario* L.). *Cell Tissue Res.* **214**: 641-649.
- Jux, C.; Leiber, K.; Hügel, U.; Blum, W.; Ohlsson, C.; Klaus, G.; Mehls, O. (1998). Dexamethasone impairs growth hormone (GH)- stimulated growth by suppression of local insulin-like growth factor (IGF)-I production and expression of GH- and IGF-I-receptor in cultured rat chondrocytes. *Endocrinology* **139**: 3296-3305.
- Kallman K. D. (1984). A new look at sex determination in poeciliid fishes. In B. J. Turner, ed. *Evolutionary genetics of fishes*. New York: Plenum Press. pp. 95-171.
- Kanamori, A. Y. Nagahama, and N. Egami (1985). Development of the tissue architecture in the gonads of the medaka *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.* **2**: 695-670.
- Kime, D.E. (1978). The hepatic catabolism of cortisol in teleost fish-adrenal origin of 11-oxotestosterone precursors. *Gen. Comp. Endocrinol.* **35**: 322-328.
- Kime, D. and Hyder, M. (1983). The effect of temperature and gonadotrophin on testicular steroidogenesis in *Sarotherodon (Tilapia) mossambicus* *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **50**: 105-115.
- Kime, D.E. (1987). The steroids. In: *Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology* Chester-Jones, I., Ingleton, P. M. E Philips, J. G. (eds). Plenum Press, New York, USA; pp.3-56.

- Kime, D.E. ; Lone, K.P.; Al-Marzouk, A. (1991). Seasonal changes in serum steroid hormones in a protandrous teleost, the sobaity (*Sparidentex hasta* Valenciennes). *J. Fish Biol.* **39**: 745-753.
- Kuwamura, T. (1986). Parental care and mating systems of cichlid fishes in lake Tanganyika: a preliminary field survey. *J. Ethol.* **4**, 129-146.
- Lagomarsino, I. V., and D. O. Conover (1993). Variations in the environmental and genotypic sex determining mechanisms across a latitudinal gradient in the fish, *Menidia menidia*. *Evolution*, **47**: 487-494.
- Lance, V. A., and M. H. Bogart (1992). Disruption of ovarian development in alligator embryos treated with an aromatase inhibitor. *Gen. Comp. Endocrinol.* **86**: 59-71.
- Lee, P. C., Goodrich, M., Struve, M., Yoon, H. I., and Weber, D. (1992). Liver and brain glucocorticoid receptors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: down regulation by dexamethasone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **87**, 222-231.
- Lee, S. T. L., Kime, D. E., Lam, T. J., and Tan, C. H. (1998). Synthesis of 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and 5 β -pregnanes in spermatozoa of primary and 17 α -methyltestosterone-induced secondary male grouper (*Epinephelus coioides*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **112**, 1-9.
- Lester, L. J., K. S. Lawson, T.A. Abella, and M.S. Palada (1989) Estimated heritability of sex ratio and sexual dimorphism in tilapia. *Aquacult. Fish. Manag.* **20**:369-380.
- Levere, R. P., Kappas, A. and Granick, S. (1967). Stimulation of hemoglobin synthesis in chick blastoderms by certain 5 β -androstane and 5 β -pregnane steroids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **58**, 985-990.

- Lidman U., Dave G., Johansson-Sjobeck M. J., Larsson A. and Lewander K. (1979). Metabolic effects of cortisol in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **63**, 339-344.
- Lindsey, C. C. (1962). Experimental study of meristic variation in a population of three-spine stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Can. J. Zool.* **40**: 271-312.
- MacIntosh, D. J. , Varghese, T. J., and Satyanarayana, G. P. (1985). Hormonal sex reversal of wild-spawned tilapia in India. *J. Fish Biol.* **26**: 87-94.
- Mair, G. C., J. A. Beardmore, and D. O. F. Skibinski (1990). Experimental evidence for environmental sex determination in *Oreochromis* species. In Proceedings 2nd Asian Fish. Forum. Tokyo, Japan, 17-22 April 1989. R. Hirano and I. Hanyu, eds. pp 555-559.
- Marcel, H. (1983). Tratado de Piscicultura. Ediciones Mundi-prensa. Madrid, Espanha.
- Mizoguchi, H., and Levere, R. D. (1971). Enhancement of heme and globin synthesis in cultured human marrow by certain 5 β -H steroids metabolites. *J. Exp. Med.* **134**, 1501-1521.
- Nagai, Y. (1992). Primary sex determination in mammals. *Zool. Sci.* **9**: 475-498.
- Nakamura M. (1978). Morphological and experimental studies on the sex differentiation of the gonad in several teleost fishes. Ph. D. thesis. Hokkaido University, Hokkaido, Japan.
- Nakamura M. (1981). Effects of 11-ketotestosterone on gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica* Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **47**: 1323-1327.
- Nakamura M., and Y. Nagahama (1985). Steroid producing cells during ovarian differentiation of the tilapia *Sarotherodon niloticus*. *Dev. Growth, Differ.* **27**: 701-708.

- Nakamura M., and Y. Nagahama (1989). Differentiation and development of Leydig cells, and change of the testosterone levels during testicular differentiation in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol. Biochem.* **7**: 211-219.
- Nakamura M., and Y. Nagahama (1993). Ultrastructural study on the differentiation of steroid-producing cells during ovarian differentiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. *Aquaculture*, **112**: 237-251.
- Nakamura M., J. L. Specker and Y. Nagahama (1993). Ultrastructural analysis of the developing follicle during early vitellogenesis in tilapia, *Oreochromis niloticus*, with special reference to the steroid producing cells. *Cell Tissue Res.* **272**: 33-99.
- Nakamura M., Kobayashi, T., Chang, X., and Nagahama, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Biol.* **281**: 362-372.
- Nandi J. (1962). The structure of the interrenal gland in teleost fishes. *Univ. Calif. Publ. Zool.* **65**: 129-212.
- Oguri M. (1982). Interrenal gland and chromaffin cells. In: Hibiya T. (ed). An atlas of fish histology. Kodansha. Tokyo and Fisher, Stuttgart, pp. 126-130.
- Pandian, T. J. and Sheela, S. G. (1995). Hormonal induction on sex reversal in fish. *Aquaculture* **138**: 1-22.
- Passino, D. R. M., (1984). Biochemical indicators of stress in fishes; an overview. In: I. M. Cairns, P. V. Hudson and J. O. Nriagu (Editors), Contaminant Effects on Fishes. Wiley, New York, NY, pp. 37-48.
- Patino, R.; Davis, K.B.; Schoore, J.E; Uguz, C.; Strüssmann, C.A.; Parker, N.C.; Simco, B.A.; Goudie, C.A. (1996). Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. *J. Exp. Zool.* **276**: 209-218.

- Pauly, D, Moreau, J. e Pren, M. (1988) A comparison of overall growth performance of tilápia in open waters and aquaculture. In: R. S. V. Pullin, T. Bhukaswan, K. Tonguthaie e J. L. Maclean (eds), The Second International Symposium on Tilápia in Aquaculture, pp. 469-479. ICLARM, Manila..
- Payne, A. I. (1983). Estuarine and salt tolerant tilápias. In: L. Fishelson e Z. Yaron (eds), proceedings of the International Symposium on Tilápia in Aquaculture, pp. 534-543. Tel-Aviv University; Tel-Aviv.
- Philippart, J.-Cl. and Ruwet, J.-Cl. (1982) Ecology and distribution of tilápias. In: R. S. V. Pullin e R. H. Lowe-McConnell (eds), The Biology and Culture of Tilápias, pp. 15-59. ICLARM, Manila.
- Pickering, A.D.; Pottinger, T.G.; Sumpter, J.P. (1987a). On the use of dexamethasone to block the pituitary-interrenal axis in the brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **65**: 346-353.
- Pickering, A.D.; Pottinger, T.G.; Carragher, J.; Sumpter, J.P. (1987b). The effects of acute and chronic stress on the levels of reproductive hormones in the plasma of mature male brown trout *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **68**: 249-259.
- Pickford G. E., Pang P. K. T., Weinstein E., Toretti, J., Hendler E. and Epstein F. H. (1970). Cortisol treatment of hipophysectomized *Fundulus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **14**, 424-534.
- Pieau, C., M. Girondot, G. Desvasges, M. Dorizzi, N. Richard – Mercier, and P. Zaborski (1994a). Environmental control of gonadal differentiation. In: The differences between the sexes. R. V. Short and E. Balaban (eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 433-448.

- Pieau, C., M. Girondot, N. Richard-Mercier, G. Desvasges, M. Dorizzi, and P. Zaborski (1994b). Temperature sensitivity of sexual differentiation of gonads in the European pond turtle: hormonal involvement. *J. Exp. Zool.* **270**: 86-94.
- Pieau, C. (1996) Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays* **18**: 19-26.
- Pieau, C., Dorizzi, M. and Richard-Mercier, N. (1999). Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 887-900
- Piferrer, F., S. Zanuy, M. Carrillo, I.I. Solar R. H, Devlin, and E. M. Donaldson (1994). Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *J. Exp. Zool.* **270**: 255-262.
- Pottinger, T. Pickering, A. D. and Hurley, M. A. (1992a). Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **103**: 275-289.
- Pottinger, T. G. and Moran, T. A. (1993). Differences in plasma cortisol and cortisone dynamics during stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Fish Biol.* **43**: 121-130.
- Pottinger, T.G.; Balm, P.H.M.; Pickering, A.D. (1995). Sexual maturity modifies the responsiveness of the pituitary-interrenal axis to stress in male rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **98**: 311-320.
- Pottinger, T.G.; Carrick, T.R.; Hughes, S.E.; Balm, P.H.M. (1996). Testosterone, 11-ketotestosterone, and estradiol, and estradiol-17 β modify baseline and stress-induced interregional and corticotropic activity in trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **104**: 284-295.

- Pullin, R. S. V. (1983). Choice of Tilapia species for aquaculture. In: L. Fishelson e Z. Yaron (eds), Proceedings of the International Symposium on Tilapia in Aquaculture, pp. 64-76. Tel-Aviv University, Tel-Aviv.
- Pullin, R. S. V. (1991). Cichlids in Aquacultura. In: M. H. A. Keenleysid (eds), Cichlid Fishes-Behaviour, Ecology and Evolution, pp. 280-309. Chapman & Hall, London.
- Purves, H. D., and Sirett, N. E. (1965). Assay of corticotrophin in dexamethasone-treated rats. *Endocrinology* **77**: 366-374.
- Quérat, B., Hardy, A., and Leloup-Hatey, J. (1986). Ovarian metabolic pathways of steroid biosynthesis in the European eel (*Anguilla anguilla* L.) at the silver stage. *J. Steroid Biochem.* **24**, 899-907.
- Readding J.M., Patino R. (1993). In: Evans DH, editor. Reproductive physiology: the physiology of fishes. Boca Raton,FL: CRC Press. pp.503-534.
- Reinboth, R. (1970). Intersexuality in fishes. *Mem. Soc. Endocrinol.* **18**: 515-543.
- Rothbards S., B. Moav, and Z. Yaron (1987). Changes in steroid concentrations during sexual ontogenesis in tilapia. *Aquaculture* **61**: 59-74.
- Rubin, D. A. (1985) Effect of pH on sex ratio in cichlids and a Poeciliid (Teleostei). *Copeia* **1**: 235-238.
- Saga, T., Oota Y, Nozaki M, Swanson P. (1993). Salmonid pituitary gonadotropins, III: chronological appearance of GTH I and other adenohipophysioal hormones in the pituitary of the developing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss irideus*).*Gen. Comp. Endocrinol.* **102**: 394-409.
- Satoh, N. (1974) An ultrastructurale study of sex differentiation in the teleost *Oryzias latipes*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **32**: 195-215.

- Scherer, G. (1999). Introduction: vertebrate sex determination and gonadal differentiation. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 821-823.
- Schreck C. B., Bradford C. S., Fitzpatrick M. S. , Patino R. (1989). Regulation of the interrenal of fishes: non-classical control mechanisms. *Fish Physiol. Biochem.* **7**: 259-265.
- Schreibman, M. P., E. J. Berkowitz, and R. van der Hurk (1982). Histology and histochemistry of the testis and ovary of the Platyfish, *Xiphophorus maculatus*, from birth to sexual maturity. *Cell Tissue Res.* **224**: 81-87.
- Schulz, R. (1986). *In vitro* metabolism of steroid hormones in the liver and in the blood cells of male rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Gen. Comp. Endocrinol.* **64**: 312-319.
- Schulz, R., Blüm V. (1991). Extragonadal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **82**: 197-205.
- Scott, A. P., and Canario, A. V. M. (1992). 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulphate; a major new metabolite of the teleost oocyte maturation-inducing steroid. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**: 91-100.
- Selye H. (1939). Effect of adaptation to various damaging agents on the female sex organs in the rat. *Endocrinology*, **25**: 615-624.
- Shapiro, D. Y. (1988). Behavioral influences on gene structure and other new ideas concerning sex change in fishes. *Environ. Biol. Fish* **23**: 283-297.
- Shapiro, D. Y. (1990). Sex-changing fish as a manipulable system for the study of the determination, differentiation and stability of sex in vertebrates. *J. Exp. Zool. Suppl.* **4**: 132-136.

- Shapiro, D. Y. (1994). Sex change in fishes – How and why? In: The differences between the sexes. R. V. Short and E. Balaban, (eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 105-130.
- Sheridan, M. A. (1986). Effects of thyroxin, cortisol, growth hormone, and prolactin on lipid metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during smoltification. *Gen. Comp. Endocrinol.* **64**, 220-238.
- Spinedi, E., Salas, M., Chisari, A., Perone, M., Carino, M., and Gaillard, R. C. (1994). Sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response to inflammatory and neuroendocrine stressors. *Neuroendocrinology* **60**: 609-617.
- Stoutbart, A.J.H.X.; Lucassen, E.C.H.E.T.; van Strien, F.J.C.; Balm, P.H.M.; Lock, R.A.C.; Wendelaar-Bonga, S.E. (1998). Stress responsiveness of the pituitary-interrenal axis during early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Endocrinol.* **157**: 127-137.
- Strüssmann, C.A.; and R. Patiño (1995). Temperature manipulation of sex differentiation in the fish. In: Proceedings of the fifth international symposium on reproductive Physiology of Fish. F. Goetz and P. Thomas, eds Fish Symp. 1995, Austin, Texas, pp. 153-157.
- Strüssmann, C.A.; Takashima, F.; Toda, K. (1996). Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* **139**: 31-45.
- Strüssmann, C.A., J. C. Calsina Cota, G. Phonlor, H. Higuchi, and F. Takashima (1996a). Temperature effects on the sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatchery*. *Environ. Biol. Fish* **47**: 143-154.

- Strüssmann, C.A., S. Moriyana, E. F. Hanke, J. C. Calsina Cota and F. Takashima (1996b). Evidences of thermolabile sex determination in pejerrey. *J. Fish. Biol.* **48**: 643-651.
- Sullivan, J. A. ; and R. J. Schultz (1986). Genetic and environmental basis of variable sex ratios in laboratory strains of *Poeciliopsis lucida*. *Evolution* **40**: 152-158.
- Sumpter, J. P., Pickering, A. D. and Pottinger, T. G. (1985). Stress induced elevation of plasma α -MSH and endorphin in brown trout *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **59**: 257-265.
- Sumpter, J. P. , Carragher, J., Pottinger, T. G., and Pickering, A. D. (1987). The interaction of stress and reproduction in trout. In "Reproductive Physiology of Fish" (D. R. Idler, L. W. Crim, and J. M. Walsh, eds.), pp. 239-302. Memorial Univ. Press, St. John's, Newfoundland, Canada.
- Sumpter, J. P. , Pottinger, T. G., Rand-Weaver, M., and Campbell, P. M. (1994). The wide-ranging effects of stress on fish. In "Perspectives in Comparative Endocrinology" (K. G. Davey, R. E. Peter, and S. S. Tobe, eds.), pp. 535-538. Natl. Res. Council of Canada, Ottawa.
- Swanson, P., Suzuki, K.,Kauwauchi, H. and Dickhoff, W.W. (1991). Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biol. Reprod.* **44**: 29-38.
- Takahashi, H., and Y. Iwasaki (1973). The occurrence of histochemical activity of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in the developing testes of *Poecilia reticulata*. *Dev. Growth Differ.* **15**: 241-253.
- Torrans, L., Meriwether, F., and Lowell, F. (1988). Sex-reversal of *Oreochromis aureus* by immersion in mibolerone, a synthetic steroid. *J. World Aquacult. Soc.* **19**: 97-102.

- Van den Hurk, R., J. G. D. Lambert, and J. Peute (1982) Steroidogenesis in the gonads of rainbow trout fry (*Salmo gairdneri*) before and after the onset of gonadal sex differentiation. *Reprod. Nutr. Dev.* **22**: 413-425.
- Van den Hurk, R. and Leeman, W. R. (1984). Increase of steroid-producing cells in interrenal tissue and masculinization of gonads after long-term treatment of juvenile rainbow trout with cyanoketone. *Cell Tissue Res.* **237**: 285-289.
- Van den Hurk, R. and van Oordt, P.G.W.J. (1985). Effects of natural androgens and corticosteroids on gonad differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **57**: 216-222.
- Van der Boon, J. G. E. E., Van den Thillart, J. M., and Addink, A. D. F. (1991). The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* **100**, 47-53.
- Varadaj, V. M. S. S. ; Kumari, and T. J. Pandian (1994). Comparison of conditions for hormonal sex reversal of Mozambique tilápias. *Prog. Fish-Cult.* **56**: 81-90.
- Vermeulen, G.J., Lambert, J. G. D., Van deer Looy M. J. W., Goos HJTh (1994). Gas chromatographic-mass spectrometric (GC-MS) analysis of gonadal steroids in plasma of the male African catfish, *Clarias gariepinus*: effects of castration or treatment with gonadotropin-releasing hormone analogue. *Gen. Comp. Endocrinol.* **96**: 288-297.
- Vermeulen, G. J.; Lambert, J.G.D.; Teitsma, C.A.; Zandbergen, M.A.; Goos, H.J.T. (1995). Adrenal tissue in the male African catfish, *Clarias gariepinus*: localization and steroid hormone secretion. *Cell Tissue Res.* **280**: 653-657.
- Vijayan, M. M. and Leatherland J. F. (1990). High stocking density affects cortisol secretion and tissue distribution in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *J. Endocr.* **124**, 311-318.

- Vijayan, M. M. , Ballantyne, J. S. and Leatherland J. F. (1991). Cortisol-induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **82**, 476-486.
- Vijayan, M. M. and Moon, T. W. (1992). Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food-deprived rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **49**, 2260-2266.
- Volodin, V. M., and I. G. Grechanov (1985). Effect of temperature on gonadal development and sex ratio in the progeny of a pair of white bream *Blicca bjoerkna*. *J. Ichthyol.* **25**: 52-59.
- Wallace, H., Badawy, G. M. I., and Wallace, B. M. N. (1999). Amphibian sex determination and sex reversal. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 901-909.
- Wibbels, T., J. J. Bull, and D. Crews (1994). Temperature-dependent sex determination: A mechanism approach. *J. Exp. Zool.* **270**: 71-78.
- Wilson, J. D., George, F. W., and Griffin, J. E. (111981). The hormonal control of sexual development. *Science* **211**, 1278-1284.
- Wu. S. M. (1990). Study on cortisol in embryos and larvae of teleosts. M. S. thesis, 57 pp. National Taiwan University, Taipei.
- Yajurvedi, H.N. and Chandramohan, K. (1994). Effects of dexamethasone and gonadotropins of the testis of the adrenalectomized lizard *Mabuya carinata* (SCHN.). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **93**: 224-231.
- Yamamoto, T. (1962). Hormonic factors affecting gonadal sex differentiation in fish. *Gen. Comp. Endocrinol. Suppl.* **1**, 341-345.
- Yamamoto, T. (1969). Sex Differentiation. In "Fish Physiology". (W.S. Hoar and D.J. Randall Eds.), Vol. 3. p. 117-175. Academic press, New York.

- Yeoh, C.G.; Schreck, C.B.; Feist, G.W.; Fitzpatrick, M.S. (1996). Endogenous steroid metabolism is indicated by fluctuations of endogenous steroid and steroid glucuronide levels in early development of the steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **103**: 107-114.
- Yoshikawa, H. and Oguri, M. (1978). Sex differentiation in a Cichlid, *Tilapia Zillii*. *J. Tokyo Univ. Fish.* **44**: 313-318.
- Young, G.; Thorarensen, H.; Davie, P.S. (1996). 11-ketotestosterone suppresses interrenal activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **103**: 301-307.
- Yu, N. W., C. Y. Hau, H.H. Ku, L. T. Chang, and H. W. Liu (1993). Gonadal differentiation and secretions of estradiol and testosterone of ovaries of *Rana catesbiana* tadpoles treated with 4-hydroxyandrostenedione. *J. Exp. Zool.* **265**: 252-257.

