

Jandyr de Almeida Rodrigues Filho

**Alterações morfológicas e hormonais das gônadas e da
hipófise da garoupa *Epinephelus marginatus* (Teleostei:
Serranidae) durante a inversão sexual**

São Paulo

2010

Jandyr de Almeida Rodrigues Filho

**Alterações morfológicas e hormonais das gônadas e da
hipófise da garoupa *Epinephelus marginatus* (Teleostei:
Serranidae) durante a inversão sexual**

**Morphological and hormonal alterations in the gonads and
pituitary of the dusky grouper *Epinephelus marginatus*
(Teleostei: Serranidae) during the sex inversion**

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

Orientador (a): Profa. Dra. Renata
Guimarães Moreira.

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

Rodrigues-Filho, Jandyr de Almeida

Alterações morfológicas e hormonais das gônadas e da hipófise da garoupa *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae) durante a inversão sexual. 134 pg.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. *Epinephelus marginatus*; 2. Inversão sexual; 3. Ovários; 4. Testículos; 5. Inibidor de Aromatase; 6. Metiltestosterona; 7. Hipófise; 8. Gonadotropinas; 9. Esteróides gonadais; I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Dedicatória

Dedico este trabalho:

- A minha filha, Luana, que fez aflorar em mim a paternidade nesses últimos anos, e assim, mudando muitas coisas em minha vida.
- A minha mãe, Crenilda, por sempre incentivar e apoiar meus estudos.
- Ao meu Pai, Jandyr, pois acredito que sempre esteve ao meu lado nas conquistas e dificuldades durante esses anos. (em memória)
- A minha orientadora, Renata, pela grande amizade durante esses anos e por acreditar em mim para condução desse trabalho.

Epígrafe

"O mundo não está ameaçado pelas pessoas más, mas sim por aquelas que permitem a maldade" (Albert Einstein).

"Temos o destino que merecemos. O nosso destino está de acordo com os nossos méritos" (Albert Einstein).

Agradecimentos

- Primeiramente agradeço ao magnífico Criador de todas as coisas deste mundo, pois foi para ele que sempre pedi forças, paciência e sabedoria quando precisei durante esses anos, e que me colocou no meio de pessoas fantásticas.

- À Dra. Renata Guimarães Moreira pela orientação, dedicação e ensinamentos durante esses anos de convivência. A concretização desse trabalho deve-se ao seu empenho, dedicação à vida profissional, paciência, persistência, e por ter me contagiado com sua empolgação do aprendizado, pois desta forma este trabalho pôde cada vez mais se aprofundar nos conhecimentos. Renata te agradeço também, não só pela orientação na vida acadêmica, e sim por muitas vezes (desde a minha chegada em Mogi das Cruzes) ensinamentos de ordem pessoal. Faltam-me bastantes palavras para agradecer à altura. Este trabalho termina, mas a amizade e admiração são eternas... Muito Obrigado mesmo.

- À Dra. Maria Inês Borella pelos ensinamentos e sugestões para a realização de parte deste trabalho em seu laboratório de Endocrinologia de Peixes/ICB-USP. Não posso deixar de agradecer a paciência em ensinar nos momentos divertidos durante a hora do café.

- À Dra. Irani por disponibilizar os ensinamentos no Laboratório de Reprodução de Peixes Neotropicais/IBB-UNESP (Botucatu), que mudou totalmente a maneira de interpretar meus resultados, sem dizer da grande paciência nas longas horas de ensinamentos e aprendizados pelo telefone.

- À Dr. Fabiana Laura Lo Nostro, do Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exatas y Naturales, Universidad de Buenos Aires – UBA, Buenos Aires, Argentina, pela sua total disponibilidade em discutir dados pertinentes relacionados ao projeto.

- Ao Sérgio Batlouni pela disponibilidade em discutir os resultados iniciais.

- Ao Eduardo Sanches Gomes diretor do instituto de Pesca por disponibilizar os peixes e infraestruras para a realização deste trabalho, e pelas discussões metodológicas durante a parte experimental. E sem contar, a prestação de serviços dos funcionários do Instituto de Pesca, em especial ao Cláudio que sempre esteve à disposição para ajudar no trabalho de campo.

- Aos amigos do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos,

pela convivência diária e auxílios que vão desde à ajudas no laboratório até aos diversos momentos divertidos que passamos juntos. Meu Muito Obrigado!! Foi muito bom ter trabalhado com vocês!! Sou muito grato a todos vocês: Aline, Amanda, Bruno, Carlos Tolussi (Kadu), Carlos E. O. Garcia (Jaboti), Cristiéle,

Juliane, Paulo, Renato, Renata, Tiago, Vanessa, Vagner (técnico), Carol, e em especial a técnica Larissa que ajudou a processar parte do material. Sinto-me sem palavras para demonstrar minha gratidão. Obrigado mesmo, espero poder recebê-los em casa qualquer dias desses.

- Aos amigos do laboratório de Endocrinologia de Peixes/ICB-USP pela acolhida, ensinamentos e risadas. Foi muito prazeroso trabalhar com vocês! Que são: Cruz Alberto, Matheus, Lázaro, Gisele, M. Inês, e em especial a Chayrra por sempre estar disposta a ensinar e acompanhar as técnicas imuno-histológicas, e pela grande amizade estabelecida.

- Aos funcionários da Pós-graduação, em especial a Gisele (pelas diversas ligações, ajudas e amizade), Roseli (pelos serviços burocráticos) e ex-funcionária a Sra. Irani pelo café que sempre teve no ponto (eee saudades desse cafezinho, que nunca mais foi o mesmo).

- A todos os amigos e colegas do departamento, são eles: Antonio, pela grande amizade; ao Felipe, pelos “helps” no mundo da informática; ao Fernando, por ajudar com o programa MATLAB; e a toda a galera que acompanhava no futebol, do cafezinho e da vila da Bio.

- À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (2007/59122-7) e bolsa concedida (Processo: 07/57106-4), possibilitando a realização deste trabalho.

- Ao grande amigo e “irmãozão” Bruno, sem palavras mano!!!

- À minha família, MUITO OBRIGADO!!! Essa vitória não é só minha, mas também de vocês. Por todo o sacrifício, pela distância, e apoio.

Meu muito Obrigado a todos que contribuíram para esse trabalho,

Jandyr Filho (Jajá)

Índice

| | |
|--|-----|
| Lista de Abreviações..... | i |
| Lista de Anexos..... | ii |
| Resumo..... | iii |
| Abstract..... | v |
| 1- Introdução..... | 1 |
| 1-1-Hermafroditismo em Peixes Teleósteos..... | 1 |
| 1.2- Controle Endócrino e Inversão Sexual Induzida..... | 2 |
| 1.3- A Espécie <i>Epinephelus marginatus</i> e Justificativa..... | 7 |
| 2- Objetivos..... | 9 |
| 2.1- Objetivo Geral..... | 9 |
| 2.2- Objetivos Específicos..... | 9 |
| 3- Materiais e Métodos..... | 10 |
| 3.1- Procedimento experimental..... | 10 |
| 3.2- Análises histológicas das gônadas..... | 12 |
| 3.3- Análises imunohistoquímicas da hipófise..... | 12 |
| 3.4- Perfil plasmático dos esteróides gonadais..... | 15 |
| 3.5 Análises estatísticas..... | 15 |
| 4- Resultados..... | 16 |
| 4.1- Índice Gonadossomático (IGS)..... | 16 |
| 4.2- Descrição gonadal antes, durante e após a inversão sexual..... | 16 |
| 4.2.1- Ovário..... | 16 |
| 4.2.2- Transição gonadal..... | 19 |
| 4.2.3- Testículo inicial (gônada invertida)..... | 19 |
| 4.3- Acompanhamento histológico durante o procedimento experimental..... | 21 |
| 4.3.1- Animais do grupo inicial..... | 21 |
| 4.3.2- Após 30 dias experimentais..... | 22 |
| 4.3.3- Após 60 dias experimentais..... | 22 |
| 4.3.4- Após 90 dias experimentais..... | 23 |
| 4.4- Análises imuno-histoquímicas da hipófise..... | 24 |

| | |
|--|------------|
| 4.5- Perfil dos esteróides gonadais ao longo do período experimental..... | 27 |
| 4.5.1- Hormônio 17β-Estradiol..... | 27 |
| 4.5.2- Hormônio Testosterona..... | 27 |
| 4.5.3- Hormônio 11-ceto-testosterona..... | 28 |
| 5- Discussão..... | 30 |
| 6- Conclusão..... | 46 |
| 7- Referencias..... | 48 |
| 8- Tabelas..... | 60 |
| 9- Figuras..... | 64 |
| 10- Anexos..... | 117 |

Lista de Abreviações

AI - Inibidores de Aromatase

CPE - Células Produtoras de Esteróides

E₂ - 17β-estradiol

EPM – Erro Padrão da Média

FSH - Hormônio Folículo-estimulante

GnRH - “gonadotropin releasing hormone”

GtHs – Gonadotropinas

IGS - Índice Gonadossomático

LAMEROA – Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos

Aquáticos

LH - Hormônio Luteinizante

MIS- Indutor da Maturação Final

MT – 17α-metiltestosterona

OP - perado testemunho

PBS - *Fosphate Buffer saline*

PI - “pars intermedia”

PPD - “proximal pars distalis”

RPD - “rostral pars distalis”

SABC - Streptavidin-Biotin-peroxidase Complex

SL – Somatolactina

T - Testosterona

11KT – 11-cetotestosterona

Lista de Anexos

| | |
|--|------------|
| Anexo 1 - Protocolo de análises de histoquímica de gônadas (ovários e testículos) e hipófise..... | 118 |
| Anexos 2 - Protocolo de análises de imuno-histoquímica de hipófise..... | 128 |
| ANEXO 3 - Protocolo de Análises dos Esteróides Gonadais (17β-estradiol, testosterona e 11ceto-testosterona)..... | 130 |

Resumo

A inversão do sexo em peixes hermafroditas sequenciais (protândricos ou protogínicos) ocorre em decorrência de diversos fatores, dentre eles, fisiológicos, genéticos, podendo ser ainda decorrência do comportamento social. Nos peixes hermafroditas marinhos as alterações sexuais são acompanhadas por alterações anátomo-funcionais das gônadas, coloração e comportamento dos animais. A espécie *Epinephelus marginatus* (garoupa verdadeira), serranídeo da fauna nativa e amplamente difundida no litoral brasileiro, é um hermafrodita protogínico que apresenta dificuldade na manutenção de indivíduos do sexo masculino em seus cardumes e, além disso, encontra-se na lista de espécies sobreexploradas. Utilizando-se técnicas de inversão sexual induzida, em cativeiro, para a obtenção de machos, este trabalho teve como objetivo estudar as alterações de alguns tecidos endócrinos durante o processo de inversão sexual, utilizando tratamentos com inibidores de aromatase (AI) e metiltestosterona (MT) em animais jovens. Ao longo de 90 dias de experimento a utilização do AI e do MT promoveu uma aparente desorganização da arquitetura gonadal padrão, massiva degeneração das células germinativas femininas, surgimento de centros melanomacrofágicos, proliferação de estruturas associadas ao sexo masculino (tecido intersticial e células germinativas masculinas) e a maturação das células germinativas masculinas. A utilização do andrógeno sintético MT (sozinho ou combinado com AI) possibilitou a obtenção de gônadas em fases mais avançadas de espermatogênese, inclusive a fase de espermiogênese inicial, com redução significativa dos valores do índice gonadossomático (IGS). Já com a utilização do AI foram encontradas gônadas em processos de intersexo mais clássicos após 90 dias experimentais. As análises de imunomarcção das células gonadotrópicas hipofisárias foram viáveis utilizando-se anticorpos de salmão e os resultados mostraram que as células produtoras de FSH (hormônio folículo-estimulante) e LH (hormônio luteinizante) distribuem-se pela “*proximal pars distalis*” e “*pars intermedia*” da adenohipófise. Os resultados obtidos com as análises imunohistoquímicas da hipófise demonstraram uma marcação de pouca intensidade utilizando-se o anticorpo anti- β FSH no grupo tratado com AI após 90 dias. A análise dos esteróides gonadais mostrou que nos animais

tratados com AI, não houve diminuição na concentração do estradiol aos 90 dias, desta forma a alça de *feedback* negativo provavelmente foi acionada, e a produção de FSH diminuiu, causando o aumento da concentração plasmática de 11 cetotestosterona (11 KT) (via ação do LH). Já nos grupos onde o MT foi administrado, houve uma diminuição na concentração de estradiol após o tratamento, causando possivelmente uma menor intensidade na alça de *feedback* negativo na hipófise, sendo a ação do andrógeno sintético mais efetiva na espermiogênese nestes animais. As análises das gônadas e da hipófise sugerem a atuação do FSH no início da transição do sexo, sendo proposta a liberação desta glicoproteína como o gatilho para a inversão sexual em hermafroditas protogínicos. Estudos mais detalhados ao longo dos 90 dias de transição gonadal em *E. marginatus* precisam ser realizados para constatar o real envolvimento do FSH na inversão do sexo e verificar se a liberação do LH estaria envolvida com a produção de 11-ceto-testosterona, a espermiogênese completa e espermiacção.

Abstract

The sex inversion in sequential hermaphrodite fish (protandrous or protogynous) occurs due to several factors, including physiological, genetics, and also can be associated with the social behavior. In marine hermaphrodite fish, the sex alterations are followed by anatomic and functional alterations in the gonads, color patterns and animal behavior. The species *Epinephelus marginatus* (dusky grouper), a native serranid and broadly distributed in the Brazilian coast, is a protogynous with problems in maintaining males in the shoal and, additionally, this species is part of the overexploited marine fish red list. Induction of sex change, in captivity, using aromatase inhibitors (AI) and 17 α -methyltestosterone (MT) has been conducted with the purpose to study the morphophysiological alteration in some endocrine tissues in juveniles. During 90 experimental days, the use of AI and MT promoted an apparent disorganization of the standard gonad architecture, a massive degeneration of the female germ cells, the appearance of melanomacrophagic centers, a proliferation of the structures associated with the male sex (interstitial tissue and male germ cells) and the maturation of male germ cells. The use of the synthetic androgen, MT (alone or combined with AI) allowed the obtaining of gonads in a more advanced spermatogenesis phase, including an initial spermiogenesis phase, with a significant reduction of gonadosomatic index (GSI). With the use of AI, the gonads were found in a more classic intersex process after 90 days of experiment. The immunostaining analysis of the gonadotropic cells were viable using salmon antibodies and the results showed that FSH and LH cells were distributed in “*proximal pars distalis*” and “*pars intermedia*” in adenohypophysis. The immunohistochemistry analysis of the pituitary showed a low intensity of staining with the anti- β FSH in the AI group, after 90 experimental days. The analysis of the gonad steroids showed that in the animals from the AI group, there was no decrease in estradiol levels after 90 days, so the negative *feedback* loop probably was activated, the FSH secretion decreased, allowing the increase of plasma 11-ketotestosterone (11KT) (through LH action). In the MT groups there was a decrease in plasma estradiol,

what probably decreased the intensity of the negative feedback loop in the pituitary, and in this case, the action of the synthetic androgen was predominant in spermiogenesis. The analysis of the gonads and pituitary suggest the action of FSH in the beginning of the sex transition, with the proposal that this glycoprotein acts triggering the sex inversion in protogynous hermaphrodites. We suggest that more detailed studies during the 90 days of gonad transition in *E. marginatus* must be done in order to find the real involvement of FSH in sex inversion and to elucidate the actual role of LH with 11KT production, the full spermiogenesis and spermiation.

1. Introdução

1.1- Hermafroditismo em Peixes Teleósteos

Os peixes teleósteos apresentam diversos mecanismos de reprodução, podendo ser encontradas desde espécies gonocóricas (indivíduos com o sexo feminino ou masculino, separadamente) com escassas características sexuais até espécies com marcado dimorfismo sexual, acasalamentos complexos e comportamento de cuidado parental, assim como hermafroditas simultâneos e hermafroditas sequenciais ou consecutivos (Atz, 1964; Reinboth, 1970, 1998; Chan & Yeung, 1983; Price, 1984; Sadovy & Shapiro, 1987; Devlin & Nagahama, 2002; Vazzoler, 1996), sendo os padrões de sexualidade determinados por diferentes fatores, sejam eles internos ou externos (Price, 1984).

O hermafroditismo tem por base a função reprodutiva (Policansky, 1982; Chan & Yeung, 1989), podendo ter indivíduos com gônadas que atuam como ovários e/ou como testículos. Uma espécie é considerada hermafrodita se uma relativa proporção de indivíduos da população funciona com ambos os sexos, seja simultânea ou sequencialmente, em algum período do ciclo de vida (Sadovy & Shapiro, 1987).

Segundo Reinboth (1988) o hermafroditismo simultâneo apresenta indivíduos com ambos os sexos funcionais ao mesmo tempo, caracterizado pela presença de tecido feminino e masculino desde os estágios iniciais de desenvolvimento gonadal, tecidos estes funcionais idênticos durante o período reprodutivo e ciclo de vida dos indivíduos. Este tipo de hermafroditismo é pouco

difundido entre os teleósteos e está restrito a espécies marinhas que habitam recifes de coral.

Por outro lado, o hermafroditismo sequencial é amplamente difundido entre os teleósteos (Reinboth, 1988) e encerra uma das mais marcantes expressões da plasticidade no desenvolvimento sexual: a mudança de sexo (Francis, 1992), existindo dois tipos de hermafroditismo sequenciais: protandria e protoginia. Na protandria, os indivíduos inicialmente são machos, e mais tarde, na vida adulta, transformam-se em fêmeas, sendo os testículos substituídos por ovários funcionais. Na protoginia, mais frequente entre os teleósteos, os indivíduos são inicialmente do sexo feminino e, posteriormente, na vida adulta, os ovários são substituídos por testículos, transformando-os em machos reprodutivamente ativos (Devlin & Nagahama, 2002). Em ambos os casos, a mudança de sexo nos indivíduos adultos envolve a degeneração do tecido gonadal do primeiro sexo e o crescimento e maturação do tecido do sexo oposto, em substituição ao anterior, passando por uma fase de intersexo (Chan, 1970).

1.2- Controle Endócrino e Inversão Sexual Induzida

Segundo Connaughton & Aida (1998), o desenvolvimento e o funcionamento do sistema reprodutor nos vertebrados em geral são dependentes da integração (através de complexas vias hormonais) de estruturas que formam o chamado eixo hipotálamo – hipófise - gônadas. Nos peixes, em especial, uma sequência de eventos que atua no sistema hormonal tem início com a percepção de estímulos ambientais (luz, temperatura, variações químicas da água), que são captados através de órgãos sensoriais e

levados ao hipotálamo como estímulos nervosos. A percepção de tais estímulos e, sua transdução no animal, perfaz a ponte entre os fatores ambientais (extrínsecos e intrínsecos), concretizando a interação entre os sistemas nervoso e hormonal (Reinboth, 1998).

O controle da reprodução desencadeada pelo eixo hipotálamo – hipófise - gônadas, começa na síntese e liberação do neurohormônio conhecido como GnRH (“gonadotropin releasing hormone”) no hipotálamo. O GnRH estimula a hipófise a liberar as gonadotropinas LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo-estimulante), que irão por sua vez estimular a produção dos esteróides gonadais (revisão em Levavi-Sivan *et al.*, 2010; Zohar *et al.*, 2010).

O FSH estimula a conversão do colesterol em testosterona nas camadas foliculares ovarianas e a testosterona é aromatizada (pela enzima aromatase) e convertida em 17β -estradiol (E_2) (Carreau *et al.*, 2002). O E_2 é o principal esteróide produzido na fase de maturação gonadal de fêmeas e sua ação é estimular o fígado a sintetizar a fosfoglicolipoproteína conhecida como vitelogenina, que é captada pelos oócitos (ação mediada pelo FSH) e incorporada na formação do vitelo, promovendo a maturação gonadal (Rocha & Rocha, 2006).

O LH estimula a síntese de 17α -hidroxiprogesterona, que é convertida em 17α - 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-one, conhecido como o hormônio esteróide indutor da maturação final (MIS – *maturation induction steroid*) (Rocha & Rocha, 2006). Nos machos, o controle da maturação dos gametas é semelhante, sendo o esteróide mais importante na maturação final, a 11-cetotestosterona (11-KT) na maioria dos teleósteos estudados.

Os esteróides sexuais, providos do eixo hipotálamo – hipófise - gônadas, são tidos como os principais fatores no controle do desenvolvimento gonadal e da reprodução nos teleósteos (Chan & Yeung, 1983, 1989; Feist *et al.*, 1990; Cardwell & Liley, 1991; Nagahama, 1994; Reinboth, 1998; Devlin & Nagahama, 2002). Desta forma, o sexo fenotípico nos teleósteos pode ser manipulado por administração desses esteróides sexuais no início do desenvolvimento do animal (Chan *et al.*, 1994, 1995; Iwamatsu, 1999) como, por exemplo, nas práticas de reversão sexual, realizada com metiltestosterona (Tachibana *et al.*, 2004) ou inibidor de aromatase (Afonso *et al.*, 2001) em tilápias.

A determinação do sexo feminino está relacionada com a manutenção dos níveis de E_2 e a diminuição desses esteróides pode interromper o processo de vitelogênese e a maturação do oócito, assim como permitir o desenvolvimento do sexo masculino (Fostier *et al.*, 1983). Estes processos estão intimamente ligados com a relação existente entre os hormônios testosterona e estradiol, pois como já foi citado o estradiol é produzido a partir da aromatização da testosterona, processo este que envolve a enzima aromatase.

O conhecimento destes processos possibilitou a utilização dos chamados inibidores de aromatase (AI) e metiltestosterona em peixes hermafroditas protogínicos, fazendo com que os AI suprimam a expressão do gene da aromatase (Kitano *et al.*, 2000), diminuindo os níveis de E_2 nas fêmeas e assim resultando em uma inversão de sexo. O metiltestosterona é um andrógeno sintético que quando administrado em peixes hermafroditas protogínico na ingestão de alimento (Sanches, 2009) ou por implantes (Sarter *et al.*, 2006) promove um aumento da concentração de testosterona no plasma sanguíneo, o desenvolvimento dos testículos e a produção de sêmen.

Sabendo-se que a síntese dos esteróides é modulada pelas gonadotropinas hipofisárias (FSH e LH) são observadas também alterações na síntese dessas gonadotropinas durante o processo de inversão sexual. Antonelli (2006) usou técnicas histológicas e imunohistoquímica em *Synbranchus marmoratus*, para localizar diferentes tipos de células da adenohipófise e comparar a distribuição entre elas. A autora observou que as células secretoras de gonadotropinas (GtHs) são mais ativas no estado inicial de inversão de sexo, do que no estado intermediário e no final da inversão, oferecendo um suporte hormonal maior durante o processo de mudança de sexo.

Estudos realizados com a espécie hermafrodita protândrica, *Acanthopagrus schlegeli* (Du *et al.*, 2005), mostraram que peixes com mais de 2 anos (idade aproximada da inversão do sexo) apresentam níveis mais baixos de LH no plasma, fora do período reprodutivo, quando invertem o sexo (para fêmeas), quando comparados com os peixes que permaneceram machos. Estas informações em peixes hermafroditas protândricos e protogínicos servem para a compreensão do papel dos hormônios hipofisários na fisiologia da reprodução e durante o processo de inversão do sexo.

Com o conhecimento da ação dos inibidores de aromatase (AI), estudos já realizados em *Epinephelus merra*, gerou uma inibição da síntese de estrogênio plasmáticos acompanhados por uma degeneração de oócitos no ovário e uma indução na síntese de testosterona com subsequente proliferação de células germinativas espermatogênicas determinando a inversão sexual em 2 meses e meio (Bhandari *et al.*, 2004). Já Alam *et al.* (2006) utilizando essa mesma

espécie, obtiveram a inversão do sexo com inibidores de aromatase durante 3 semanas de tratamento.

Sarter *et al.* (2006) utilizaram implantes de metiltestosterona em exemplares juvenis de *E. marginatus* e obtiveram a inversão completa do sexo dos animais em 12 semanas. Sanches *et al.* (2009) realizaram experimentos adicionando o hormônio masculinizante metiltestosterona na ração desses animais pelo período de seis meses, obtendo sucesso na inversão do sexo em indivíduos com peso variando de 200 a 2000 g. Já Cabrita *et al.* (2009) utilizando implantes de metiltestosterona, obtiveram a inversão do sexo de indivíduos imaturos e fêmeas em cerca de 2 meses, no entanto este procedimento necessitou de repetições pelo período de 3 anos, pois a inversão do sexo não foi permanente. Com *E. marginatus*, ainda não foram realizados experimentos de inversão do sexo utilizando-se os inibidores de aromatase.

Em hermafroditas sequências a mudança de sexo é caracterizada pelo decréscimo da atividade gametogênica do primeiro sexo e aumento da atividade do tecido germinativo do sexo oposto. Observam-se eventos simultâneos durante este processo, como: aparente desorganização da arquitetura gonadal padrão; massiva degeneração das células somáticas e germinativas e de tecido intersticial, com o aparecimento de estruturas típicas do segundo sexo (Besseau & Bruslé-Sicard, 1991; Bruslé-Sicard & Fourcault, 1997; Grier & Taylor, 1998; Johnson *et al.*, 1998). Tal diferenciação do sexo oposto pode acontecer a partir de um estoque permanente de células tronco ou células germinativas dormentes até o momento da inversão do sexo (Bruslé-Sicard *et al.*, 1994).

1.3- A Espécie *Epinephelus marginatus* e Justificativa

Exemplos de hermafroditismo sequencial ocorrem nos serranídeos, (família Serranidae, sub-família Epinephelinae) que compreende 159 espécies distribuídas em 15 gêneros (Heemstra & Randall, 1993). Diversas espécies ocorrem em ambientes costeiros do litoral do Brasil. Destas, as que atingem maior tamanho são o mero (*Epinephelus itajara*), a garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*), o badejo-quadrado (*Mycteroperca bonaci*) e o badejo-de-areia (*Mycteroperca microlepis*), ultrapassando um metro de comprimento e mais de 40 kg de peso (Smith, 1971).

A espécie *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) é hermafrodita protogínica, característica do litoral rochoso, que vive desde águas rasas até 200 metros de profundidade. Segundo alguns autores, estudos prévios sobre a reprodução da espécie mostraram que a primeira maturação sexual ocorre quando o indivíduo atinge cerca de 45 cm e 2kg (idade aproximada de 5 anos) e a inversão sexual da garoupa-verdadeira ocorre a partir dos 10 anos de idade com o comprimento e o peso superior a 83 cm e 9 kg, respectivamente (Chauvet, 1981; Bruslé, 1985; Spedicato *et al.*, 1995; Andrade *et al.*, 2003).

Esta espécie é amplamente distribuída no litoral sudeste do Brasil (Barreiros, 1998), encontrada na Lista Nacional das Espécies de Peixes Ameaçados de Sobreexploração (Brasil, 2004) e regionalmente extinta no Estado de São Paulo (São Paulo, 2008; Rodrigues-Filho *et al.*, 2009).

Todo esse esforço na tentativa de inversão do sexo de *E. marginatus* deve-se às dificuldades na obtenção do macho da referida espécie para que se possam conduzir os trabalhos de reprodução induzida e um futuro repovoamento da espécie na costa brasileira, percebendo a importância na

conservação da espécie e seu potencial econômico. Pois, a inversão do sexo ocorre tardiamente na vida do animal, os machos são de grande tamanho e vivem em grandes profundidades, o que torna difícil a sua captura.

2 – Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Investigar as alterações fisiológicas durante a inversão sexual induzida em *Epinephelus marginatus*, garoupa verdadeira;

2.2- Objetivos Específicos

- Monitorar as alterações histomorfológicas das gônadas e da hipófise da garoupa durante o processo de inversão sexual induzida com metiltestosterona e inibidores de aromatase;

- Identificar as estruturas e células testiculares durante a transição do sexo;

- Avaliar de forma semiquantitativa as células produtoras de FSH e LH na hipófise;

- Avaliar o perfil plasmático dos esteróides gonadais durante o processo de inversão de sexo.

3- Materiais e Métodos

3.1- Procedimento experimental

O experimento foi realizado no período de dezembro de 2008 a março de 2009 no Instituto de Pesca de Ubatuba, localizado na Baía do Itaguá (Figura 1 A). A condução do experimento foi em tanques-rede, no mar, buscando assim as melhores condições ambientais para a sanidade dos animais e a possibilidade de mantê-los em um sistema mais próximo possível das suas condições naturais.

No total, foram utilizados 12 tanques-rede compostos por um sistema de balsas flutuantes com 6 tanques-rede de 8 m³, com cabos de aço ligados às poitas para ancorar e estabilizar as balsas no mar, e mais 6 tanques-rede de 8 m³ flutuantes de tubo de polietileno de alta densidade. Os tanques-rede foram ancorados em frente à base do Instituto de Pesca de Ubatuba (Figura 1 B).

No presente experimento foram utilizados 55 animais imaturos, segundo o padrão do comprimento e peso para a primeira maturação sexual encontrada na literatura. Esses animais foram anestesiados com benzocaína (Figura 1C), a massa corpórea (Figura 1D) assim como o comprimento total (Figura 2A) foram registrados e, os peixes foram marcados individualmente com o uso de chips eletrônicos (*transponders*, TROVAN®) (Figura 2B) aplicados na musculatura dorsal (Figura 2C). Após esses procedimentos esses animais foram divididos primeiramente em diferentes grupos de massa corpórea para, posteriormente, serem subdivididos novamente em grupos de tratamentos diferentes, conforme apresentado na Tabela 1. As garoupas foram divididas em 4 grupos de tratamentos: 1) operado testemunho (OP), que receberam apenas o veículo

utilizado para os implantes (óleo de peixe); 2) Inibidor de Aromatase (AI) com doses de 100 mg/Kg do inibidor de aromatase conhecido comercialmente por Letrozole (*Venturepharm*, Beijing); 3) 17 α Metiltestosterona (MT) (andrógeno sintético) com doses de 15 mg/Kg; 4) Tratamento misto (AI + MT), com doses de 100 mg/Kg de Inibidor de Aromatase e 7,5 mg/Kg de metiltestosterona. A utilização deste último grupo será discutida mais adiante. Todos os animais de diferentes tratamentos receberam 1 ml de veículo utilizado no implante.

Os implantes foram preparados individualmente para cada animal em tubos de ensaio (Figura 2 D), no momento a aplicação os implantes foram homogeneizados com agitador do tipo *vortex* e aplicados na musculatura dorsal com o uso de seringas plásticas com agulhas descartáveis (Figura 2 E). Após a implantação do tratamento foi aplicado no orifício aberto na musculatura do animal uma cola adesiva de uso veterinário (VetBond, 3M[®]) para evitar que o implante fosse perdido.

Os procedimentos experimentais foram realizados durante 90 dias, nos quais os animais receberam implantes no dia zero (início do experimento), 30 dias e 60 dias. Foram sacrificados 4 animais no início do experimento (dia zero) para compor o grupo inicial, após 30 dias e 60 dias foram sacrificados 2 animais de cada tratamento, e ao final dos 90 dias experimentais foram sacrificados 5 animais de cada tratamento (Tabela 2).

Quando sacrificados e após a obtenção dos dados biométricos, foram coletadas as gônadas e hipófise dos animais dos diferentes grupos de tratamento para posteriores análises histológicas e imunohistoquímicas. As gônadas foram pesadas para o cálculo do índice gonadossomático (IGS = [peso das gônadas/peso total do animal] x100).

3.2- Análises histológicas das gônadas

As gônadas foram removidas e fixadas por 24 horas com diferentes fixadores indicados na literatura (Bouin, Formalina Tamponada a 4%, a 4° C ou Karnovsky), e após esse período as gônadas foram transferidas e conservadas em álcool 70%. Posteriormente o material foi desidratado, infiltrados e incluídos em *paraplast* e resina para serem seccionados em micrótomo com espessura de 5 µm e corados com Hematoxilina-Eosina e PAS + Metanil Yellow (Anexo 1). A técnica de coloração de PAS+Metanil Yellow foi realizada no Laboratório de Reprodução de Peixes Neotropicais, Departamento de Morfologia, I.B., UNESP, Botucatu/SP.

As secções histológicas foram analisadas e documentadas através de sistema computadorizado para análises de imagens (Camera: *Leica DFC 295*; Programa: *Leica Application suite V3*) no Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA), Departamento de Fisiologia, I.B., USP. A classificação morfológica para o ovário e o desenvolvimento oocitário das fêmeas foi realizada conforme Grier *et al.*, (2009). Para o estudo dos testículos e a espermatogênese foram utilizados os critérios descritos por Grier & Uribe (2009).

3.3- Análises imunohistoquímicas da hipófise

Após a abertura da caixa craniana, a hipófise foi retirada juntamente com o encéfalo e fixada por 20-24 horas em líquido de Bouin e após esse período foram conservadas em álcool 70%. Posteriormente foram desidratadas, diafanizadas e infiltradas em *paraplast* segundo técnicas histológicas de rotina.

Secções seriadas de 5µm foram obtidas e, após desparafinizados, os cortes foram corados com Tricrômico de Mallory e Ácido Periódico de Shiff para a melhor localização da anatomia da hipófise e determinação de suas diferentes áreas a serem analisadas (Anexo 1).

Para as reações imunohistoquímicas, as secções histológicas foram processadas de acordo com o método SABC (Streptavidin-Biotin-peroxidase Complex). O material foi desparafinado, hidratado e submetido ao bloqueio da peroxidase endógena com 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em tampão PBS (*Fosphate Buffer saline*) (pH 7,6) por 10 minutos. Os cortes foram lavados em tampão PBS e o bloqueio inespecífico foi realizado com 5% de leite em pó desnatado (Molico ®, sem adição extra de Ca⁺²) em tampão PBS por 15 minutos. O material foi incubado por 24 horas à 4°C com os anticorpos primários nas diluições especificadas na Tabela 3. Todos esses anticorpos são de *chum salmon* (*Oncorhynchus keta*) e foram gentilmente doados pelo professor Dr. H. Kawauchi (*School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Iwate, Japan*). Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS, incubadas com anticorpo secundário biotilado por 30 minutos, lavadas novamente em PBS e incubadas com o reagente SABC (Streptavidin-Biotin-peroxidase Complex) por mais 30 minutos. Após lavagem em PBS, o material foi revelado com 0,05% de DAB (3',3'-diaminobenzidina) em tampão PBS contendo 0,03% H₂O₂. As lâminas foram desidratadas, montadas e analisadas sob um sistema computadorizado de captura de imagens. Como controle negativo, algumas lâminas tiveram o anticorpo primário omitido e substituído por PBS (Anexo 2).

As lâminas preparadas foram analisadas sob microscopia de luz (ZEISS – Anxioskop2) e realizado a capturas de imagens (PIXERA) por sistema computadorizado no Laboratório de Endocrinologia de Peixes no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Após a identificação das partes da adeno-hipófise (*proximal pars distalis*, *rostral pars distalis*, *pars intermedia*) e as regiões da imunomarcagem das células gonadotrópicas (marcação de coloração marrom) foi realizada a captura das imagens com tamanho de 1260 por 960 *pixels*. Essas imagens foram capturadas em sequências da esquerda para a direita entre uma extremidade a outra (ver figura 3 A). O número de imagens foi variável de acordo com o tamanho da hipófise, variando de 7 a 13 imagens por hipófise.

As imagens capturadas foram agrupadas para proceder uma análise qualitativa, na qual a intensidade de marcação foi comparada entre os diferentes grupos experimentais. Além disso, a intensidade de marcação entre os anticorpos anti(-FSH e anti(-LH também foi comparada, com a finalidade de analisar, também do ponto de vista qualitativo, possíveis diferenças de marcação de ambas gonadotropinas nos grupos experimentais.

As imagens capturadas foram analisadas por um programa de análise de dados e imagens (MATLAB – The Math Works INC). Neste programa é possível contabilizar a porcentagem da coloração selecionada em toda a extensão da imagem, ou seja, analisando pixel a pixel a cor selecionada na imagem (Figura 3B). Esta análise de imagem foi realizada apenas nos animais iniciais (controle) e após 90 dias de tratamento, pois esses eram os únicos períodos em que o tamanho amostral foi adequado para uma análise estatística robusta.

3.4 - Perfil plasmático dos esteróides gonadais

Nos animais anestesiados amostras de sangue foram retiradas através da vasculatura caudal (cerca de 3ml) utilizando agulhas e seringas previamente heparinizadas (Heparina Sódica Liquemine-5000 UI/Roche) para obtenção do plasma. As amostras de sangue foram coletadas dos animais sacrificados e daqueles que continuavam no experimento. O sangue retirado foi transferido para tubos heparinizados e centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos, sendo o plasma separado em alíquotas, colocadas em criotubos e armazenado em gelo seco, sendo então transportado para o LAMEROA e estocados em freezer -80° C. No plasma sanguíneo foram quantificados por método de Elisaimunoensaio os seguintes hormônios esteróides gonadais: 17 β -estradiol (InterKit[®]), testosterona (Interkit[®]) e 11-cetotestosterona (Cayman Chemicals[®]). As leituras foram realizadas em microplacas (Spectra MAX 250) a um comprimento de onda de 450 nm para o hormônio 17 β -estradiol e testosterona, e de 405 nm para 11-cetotestosterona. O detalhamento do protocolo está descrito no anexo 3.

3.5- Análises estatísticas

Os valores do índice gonadossomático (IGS) e a porcentagem de marcação do método de análise de imagem estão apresentados como média \pm EPM e foram comparados entre os diferentes tratamentos utilizando-se análise de variância (*one-way*, ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, utilizando-se o programa estatístico BioEstat 5.0.

4- Resultados

4.1- Índice Gonadossomático (IGS)

De acordo com o gráfico da figura 4 A, o cálculo do IGS possibilitou identificar uma diminuição da massa gonadal entre os grupos experimentais após 90 dias. Os animais do grupo operado testemunho apresentaram um valor médio de IGS de $0,055 \pm 0,0125$ sendo este significativamente diferente dos grupos AI + MT e MT ($P = 0,022$). O IGS do grupo tratado com inibidor de aromatase foi de $0,040 \pm 0,0137$, valor médio significativamente igual aos demais grupos ($P = 0,314$ para OT; $P = 0,116$ para MT e $P = 0,065$ para MT + AI). Já nos animais dos grupos MT e do grupo misto (AI+MT) os valores médios do IGS foram semelhantes ($P = 0,891$).

Esta diminuição da massa gonadal e possível desestruturação da arquitetura gonadal do primeiro sexo para o segundo sexo, comparando-se os animais do grupo operado testemunho e os animais tratados com metiltestosterona, foi observada macroscopicamente durante a coleta do órgão (Figuras 4 B, C, D).

4.2 – Descrição gonadal antes, durante e após a inversão sexual

4.2.1- Ovários

Os ovários de *E. marginatus* são órgãos pares, saculiformes e não muito alongados, localizados dorsalmente na cavidade celomática no sentido longitudinal (Figura 4 B). Sua organização é do tipo cisto-ovariana, apresentando o compartimento luminal contínuo. Ambos os gonoductos se

unem na porção caudal e desembocam na papila urogenital. O compartimento germinal (Figura 5 A) tem forma de lamelas (Figura 5B), que se projetam a partir da cápsula gonadal (Figura 5 A, B) em direção à luz do órgão. As lamelas são formadas pelo epitélio germinativo e o estroma (Figura 5 C, D), o epitélio germinativo é suportado pela membrana basal que separa os dois compartimentos, germinativo e somático (Figura 5 C, D). O epitélio germinativo é composto por dois tipos celulares: as células germinativas e as células somáticas (células pré-foliculares) (Figura 5 D). O epitélio germinativo margeia as lamelas e conseqüentemente delimita o compartimento luminal (Figura 5 C). As gônias (primeiras células da linhagem germinativa - células germinativas indiferenciadas) (Figura 5 C) presentes no epitélio germinativo dividem-se várias vezes por mitose, se auto-renovam e/ou diferenciam-se em oogônias que se reúnem em ninhos (Figura 5 D; 6 A).

As oogônias são células arredondadas que apresentam o núcleo grande, esférico e com apenas um nucléolo bem evidente; e o seu citoplasma é escasso (Figura 5 D, E, F). Nos ninhos, as oogônias entram em meiose dando origem aos oócitos, que avançam para prófase da primeira divisão e estacionam em diplóteno (Figura 5 E, F). Os oócitos nessa etapa são denominados de cromatina nucleolar. Os oócitos profásicos iniciais (cromatina nucleolar leptotênico) apresentam o núcleo redondo, fortemente mais basófilico quando comparado com as oôgonias (Figura 6 B).

As células pré-foliculares (Figura 5 D), oriundas do epitélio germinativo, interpenetram progressivamente entre os oócitos presentes nos ninhos, envolvendo e individualizando-os. Gradualmente as células pré-foliculares sintetizam a membrana basal (Figura 5 C, D), que progressivamente envolve o

folículo em formação. Ao término desse processo os oócitos profásicos finais (cromatina nucleolar diplóteno) (Figura 5 E, F) aumentam o volume do citoplasma tornando-se gradualmente mais basófilo e iniciando o crescimento primário (Figura 5 C, E, F; 6 A, B, C). Uma vez que a membrana basal tenha sido sintetizada, o oócito deixa o ninho, e a teca organiza-se. No, agora complexo folicular isolado, os oócitos diplotênicos em crescimento primário, inicialmente apresentam um único nucléolo (crescimento primário com um nucléolo) (Figura 5 F) e posteriormente apresentam um número variável de nucléolos, os quais inicialmente localizam-se na região central do núcleo (crescimento primário com múltiplos nucléolos) (Figura 5 C; 6A). Conforme avança em crescimento primário os nucléolos migram para a periferia do núcleo (crescimento primário perinucleolar) (Figura 6 A).

Nos ovários de *E. marginatus* células somáticas com características de células produtoras de esteróides (CPE), semelhantes às células de Leydig, são encontradas em aglomerados celulares imersos na cápsula gonadal próximas a grandes vasos sanguíneos; essas células tem formatos oval, exibindo um núcleo pequeno e esférico com cromatina compacta, e um citoplasma de aspecto homogêneo com numerosos pontos acidófilos (Figura 6 C, D, E).

As análises histológicas das gônadas de *E. marginatus* dos animais utilizados no grupo inicial e operado testemunho, no período de tempo considerado para o experimento, mostram que o desenvolvimento oocitário evolui somente até o crescimento primário em fase de perinucleolar (Figura 6 A).

4.2.2- Transição gonadal

Durante a transição gonadal, após os implantes de AI e MT, as análises histológicas gonadais demonstram diversos eventos simultâneos: aparente desorganização da arquitetura gonadal (Figura 7 A, C, E); massiva degeneração das células somáticas e germinativas (Figura 7 B, D), e estruturas associadas do primeiro sexo; presença de estruturas provavelmente envolvidas na remoção e reabsorção de restos teciduais, denominados centros melanomacrofágicos (Figura 7 D); e intensa proliferação das células germinativas e de tecido intersticial, com o aparecimento de estruturas típicas do segundo sexo (Figura 7 D, F).

Durantes os acontecimentos, relatados a cima, as gônadas em transição são denominadas *intersexo* e é formada pela cápsula gonadal, compartimento luminal e compartimento germinativo (Figura 7 A, C, E). Durante a transição de sexo o epitélio germinativo substitui progressivamente as células germinativas femininas e o estroma ovariano, respectivamente por células germinativas masculinas e tecido intersticial típico do testículo (Figura 7 A-F). As gônias encontradas no epitélio germinativo, do agora pressuposto testículo, proliferam e diferenciam-se em espermatogônias as quais são envolvidas pelas células de Sertoli formando os espermatocistos (Figura 7 F) e posteriormente iniciam a espermatogênese.

4.2.3- Testículo inicial (gônada invertida)

O testículo inicial de *E. marginatus*, ainda não totalmente diferenciado, é composto por tecido intersticial e epitélio germinativo (Figura 8A, B). O epitélio germinativo masculino é formado, assim como o epitélio germinativo feminino,

por dois tipos celulares: as células germinativas e as células somáticas (células de Sertoli) (Figura 8 A-B). Os aglomerados de CPE nos testículos, agora denominadas células de Leydig (Figura 8 A, B; 9 A, B, E, G), são encontradas imersas na cápsula gonadal em maior quantidade que nas fêmeas. As gônias encontradas no epitélio germinativo (Figura 9 C, D) dividem-se e auto renovam-se, dando origem as espermatogônias (Figura 9 A, C, D), que são as maiores células da linhagem germinativa masculina, sua forma é esférica ou oval, núcleo volumoso, central, com cromatina finamente granulada, geralmente apresentando um único nucléolo e seu citoplasma é levemente acidófilo (Figura 9 A, C, D, F). Cada espermatogônia é envolvida individualmente por processos citoplasmáticos das células de Sertoli (Figura 9 C, D) formando um espermatocisto. No interior de cada cisto, iniciando a espermatogênese, ocorre uma proliferação mitótica das espermatogônias primária, originando as espermatogônias secundárias (Figura 9 B) com as mesmas características das anteriores. As espermatogônias secundárias dividem-se várias vezes por mitose e depois entram em meiose originando numerosos espermatócitos (Figura 9 A, D, E).

Os espermatócitos são células esféricas com o tamanho similar da espermatogônia secundária, apresentando o núcleo inicialmente basófilico, não possuem nucléolo e o citoplasma é escasso (Figura 8B; 9 A, D, F). São identificados pelo padrão de arranjo dos cromossomos característico das etapas da prófase I. Os espermatócitos primários completam a primeira divisão da meiose formando os espermatócitos secundários; estes apresentam um tamanho menor, o núcleo mais compactado e o citoplasma ainda mais escasso. Os espermatócitos secundários são vistos com menos frequência,

pois rapidamente após a segunda meiose originam as espermatídes iniciais (Figura 9 D). No interior dos espermatocistos as espermatídes diferenciam-se em um processo denominado espermiogênese. Durante a espermiogênese o núcleo das espermatídes diminui gradualmente o diâmetro, e forma-se o flagelo. As espermatídes finais são células completamente esféricas e de tamanho ainda menor, com citoplasma escasso, o núcleo com cromatina bastante compacta (Figura 9 F). Dando continuidade a este processo os espermatocistos se abrem liberando, agora, os espermatozóides (Figura 9 G).

4.3- Acompanhamento histológico durante o procedimento experimental

4.3.1- Animais do grupo inicial

Os animais do grupo inicial foram classificados como jovens de acordo com o padrão de desenvolvimento gonadal para fêmeas imaturas, nos quais eram encontradas, no compartimento germinativo, apenas as seguintes células germinativas femininas: oogônias, oócitos cromatina nucleolar em diferentes fases da prófase I e os oócitos em crescimento primário até a fase de perinucleolar (Figura 10 A-F).

Foi possível observar que algumas gônadas desses animais jovens apresentavam estruturas típicas de tecido gonadal masculino: compartimento intersticial em pequena quantidade (Figura 10 C, D) e células produtoras de esteróides (Figura 10 B, C).

4.3.2- Após 30 dias experimentais

Após o período de 30 dias experimentais foi possível observar nas gônadas dos animais tratados com inibidores de aromatase (AI) uma ligeira desorganização da arquitetura gonadal padrão e uma proliferação do tecido intersticial ocorrendo da periferia da cápsula gonadal em direção às lamelas ovarianas, mostrando então um início de inversão sexual (Figura 11 A).

Já nos grupos em que foi fornecido o andrógeno, grupos metiltestosterona e AI+MT, foi observado um padrão de inversão sexual muito semelhante. As gônadas desses animais encontraram-se em estágios mais avançados de inversão sexual, sugerindo uma maior desorganização gonadal (Figura 11C), um aumento do tecido intersticial (Figura 11B, C) e sendo possível observar oócitos em crescimento primário em fase de degeneração e reabsorção (Figura 11 B, C). Esses oócitos em degeneração são facilmente identificados por apresentar inicialmente uma desorganização, seguida por uma dissociação das estruturas citoplasmáticas (Figura 11 B, C).

Os animais do grupo operado testemunho permaneceram com os mesmos padrões de desenvolvimento celular dos animais iniciais (Figura 10 A-F).

4.3.3- Após 60 dias experimentais

Após o período de 60 dias os animais do grupo AI mostraram-se com uma maior desorganização da arquitetura gonadal (Figura 12 A), um aumento do compartimento intersticial (Figura 12 B) e diversos oócitos em crescimento primário sendo degenerados e reabsorvidos (Figura 12 C). Os tratamentos com andrógenos já se apresentavam em estágios mais avançados de inversão

sexual, pois em alguns animais não eram observados mais os oócitos degenerados (Figura 12 C), podendo ser visualizados cistos de células germinativas em estágios mais avançados da espermatogênese. Em apenas um animal deste grupo pode-se observar um início de formação do ducto espermático e a liberação de espermatozóides (Figura 12 E). Já os animais do grupo operado testemunho permaneceram com o mesmo padrão celular dos animais iniciais (Figura 10 A-F).

4.3.4- Após 90 dias experimentais

Após 90 dias de experimento os animais do grupo AI mostraram-se em estágios mais avançados de inversão (Figura 13 A, B) comparados com os animais do grupo inibidor de aromatase com 60 dias experimentais (Figura 10 A). Além de demonstrar uma maior desorganização gonadal, foram observados no compartimento intersticial cistos de células germinativas masculinas em diferentes estágios da espermatogênese (espermatogônias, espermatócitos, espermátides iniciais) (Figura 13 B). No entanto, ainda eram encontrados oócitos em degeneração (Figura 13 B).

Os animais dos grupos experimentais nos quais foram administrados andrógenos sintéticos mostraram-se com uma arquitetura gonadal mais próxima do sexo masculino (Figura 13 C) e com muitos cistos de células germinativas masculinas em diversos estágios da espermatogênese (Figura 13 F), sendo possível observar em maior quantidade de cistos de células germinativas com espermatogônias, espermatócitos e espermátides (Figura 13 F) e início de rompimento dos espermatocistos e liberação de espermatozóides (Figura 13 E).

Em todos os grupos foram detectados centros melanomacrofágicos no tecido gonadal – estrutura esta provavelmente envolvida na remoção e reabsorção de restos teciduais (Figura 13 D). Ao término dos 90 dias experimentais todos os animais do grupo operado testemunho permaneceram com o mesmo padrão de desenvolvimento gonadal relatados para fêmeas jovens (Figura 10 A-F).

4.4- Análises imuno-histoquímicas da hipófise

A hipófise de *Epinephelus marginatus* se localiza na base do diencéfalo (Figura 14 A) e estabelece uma relação anatômica e funcional com o hipotálamo através do pedúnculo hipofisário (Figura 14 B). A hipófise é dividida em duas regiões distintas: a neuro-hipófise e a adeno-hipófise (Figura 14 C). A neuro-hipófise é constituída pela *pars nervosa* que penetra e se ramifica no interior da adeno-hipófise (Figura 14 C, D). A adenohipófise é subdividida em “rostral pars distalis” (RPD), “proximal pars distalis” (PPD) e “pars intermedia” (PI), de acordo com as características tintoriais de suas células produtoras de hormônios (Figuras 14 E, F). A RPD ocupa a porção mais rostral ou anterior da glândula (Figura 14 F), envolvendo o pedúnculo hipofisário, logo que este penetra na adeno-hipófise (Figuras 14 E, F). A PPD situa-se entre a RPD e a PI, e caracteriza-se por ser mais basófila do que as outras regiões da hipófise (Figura 14 E). A PI localiza-se na porção mais caudal ou posterior da glândula (Figura 14 F) e recebe a maior quantidade dos ramos da neuro-hipófise (Figuras 14 E e 20 D).

Foi realizada uma imunomarcção das células produtoras de somatolactina (SL) para evidenciar a região da PI (Figura 15 A), pois são

células características desta região nos demais teleosteos. As células de SL estão localizadas na periferia das ramificações da neuro-hipófise e são facilmente distinguidas das células gonadotrópicas por apresentar menor tamanho (Figuras 15 A, B).

As células gonadotrópicas de *E. marginatus* foram imunorreativas aos dois anticorpos utilizados, anti-gonadotropinas de salmão: β -FSH (Figura 15 C) e β -LH (Figura 15 D). Essas células são globosas, com o núcleo bastante excêntrico e citoplasma abundante (Figuras 15 E, F). Pela imuno-histoquímica nas secções histológicas seriadas e com o uso de anticorpos específicos foi possível demonstrar que as células gonadotrópicas de *E. marginatus* não apresentaram dualidade, ou seja, foram detectados dois tipos celulares produzindo FSH e LH individualmente (Figuras 15 C, D, E, F). Além disso, o uso dos anticorpos específicos para a subunidade β (β -FSH e β -LH) mostrou que além do FSH e do LH serem sintetizados em células gonadotrópicas diferentes, estas estão localizadas em diferentes regiões da adeno-hipófise na maioria dos animais, independente dos grupos de tratamentos (Figuras 16 A, B).

Realizando uma análise qualitativa das marcações nas células gonadotrópicas imuno-reativas foi possível observar que as células produtoras de LH estão presentes em maiores quantidades e intensidades (coloração mais evidente, ou seja, maior quantidade de hormônio marcado), independente do grupo experimental (Figuras 16 B, 15 F), quando comparadas com as células produtoras de FSH (Figuras 16 A, 15 E).

Relacionando-se as células de FSH e seu acúmulo (intensidade de marcação) nos diferentes tratamentos (análise qualitativa), notou-se que todos os animais do grupo AI, após 90 dias de tratamento, tiveram uma marcação

fraca (Figuras 17 A, B, C, D). Porém, para os outros grupos de tratamentos e, realizando essa mesma análise qualitativa para as células produtoras de LH, não foi possível estabelecer essa mesma relação.

A condução de uma análise qualitativa acerca da localização das células gonadotróficas nas diferentes regiões da adeno-hipófise mostrou que no grupo operado-testemunho as células de FSH estão localizadas na região da “pars intermedia” (PI) (Figuras 18 A, B, C, D), e nos outros grupos experimentais ocorreu indistintamente na PPD e PI (Figuras 18 E, F). As células produtoras de LH estão localizadas na região da “proximal pars distalis” e na “pars intermedia” (PI) em todos os grupos experimentais (Figuras 19 A, B, C, D).

Nas análises semi-quantitativas realizadas com o programa de análise de imagens (*MATLAB*), que fornece a porcentagem de pixel marcado em relação ao tamanho total da imagem, não foram evidenciadas diferenças estatísticas significativas na porcentagem das células imuno-reativas com anti β -FSH ($P = 0,181$) e anti β -LH ($P = 0,570$) nos diferentes grupos experimentais após 90 dias. Os resultados estão apresentados nas tabelas 4.

Foi realizada uma análise semi-quantitativa quanto a porcentagem de marcação das células de FSH e LH na região da adenohipófise comparando-as com o grau de inversão sexual que ocorreram nas gônadas independente dos tratamentos realizados. A análise foi dividida em três grupos: animais que permaneceram fêmeas, nos intersexo, e os machos. Da mesma forma, não foram evidenciadas diferenças estatísticas significativas na porcentagem das células imuno-reativas com anti β -FSH ($P = 0,521$) e anti β -LH ($P = 0,787$) entre os animais que permaneceram fêmeas, os intersexos e os machos após 90 dias experimentais. Os resultados estão apresentados nas tabelas 5.

4.5- Perfil dos esteróides gonadais ao longo do período experimental

4.5.1- Hormônio 17 β -Estradiol

As concentrações do estrógeno 17 β -estradiol (E_2) apresentaram variações ao longo do período experimental no grupo MT, no qual houve uma diminuição significativa ($P=0,0016$) progressiva com 60 e 90 dias após o início experimento. Por outro lado, no grupo MT+AI com 30 dias houve um aumento significativo de E_2 ($P= 0,0032$) em relação aos demais grupos. Não foram observadas diferenças estatísticas no perfil plasmático de E_2 nos grupos OP ($P= 0,336$) e AI ($P= 0,509$) ao longo de todo período experimental (Figuras 21 A-D).

Comparando-se o perfil de E_2 entre todos os grupos experimentais durante os períodos amostrais pode-se observar que após 30 dias de início do experimento, houve um aumento significativo ($P= 0,007$) de E_2 nos grupos tratados com andrógenos (MT e MT+AI). Após 60 e 90 dias do início dos experimentos não foram observadas variações significativas entre os grupos ($P= 0,514$ e $P= 0,256$, respectivamente) (Figura 22 A-C).

4.5.2- Hormônio Testosterona

O perfil hormonal da testosterona (T) no grupo operado testemunho não apresentou diferenças estatísticas ($P= 0,150$) ao longo dos 90 dias experimentais. Nos grupos de tratamentos com AI 60 dias houve um aumento significativo da concentração plasmática de testosterona em relação ao grupo inicial e 30 dias de experimento ($P= 0,0002$), e posteriormente, com 90 dias, os valores retornaram aos níveis iniciais. No grupo MT também foi observado um

aumento significativo ($P= 0,0001$) com 60 dias em relação aos demais grupos. No grupo MT+AI também foi observado um aumento significativo ($P= 0,0001$) com 30 e 60 dias experimentais, em relação ao grupo inicial, porém o pico de concentração, ao contrário dos demais grupos, ocorreu com 30 dias de experimento (Figuras 23 A-D).

Verificando o perfil da testosterona nos grupos após o período de 30 dias amostrais notou-se um aumento significativo no grupo MT e MT+AI em relação ao grupo OP e AI, sendo que o grupo MT+AI foi significativamente maior ($P= 0,0001$) que o grupo MT. Com 60 dias observou-se um aumento significativo ($P= 0,0034$) apenas no grupo de tratamento com MT. Após 90 dias experimentais observou-se uma diminuição significativa ($P= 0,0046$) de testosterona no grupo AI, MT e MT+AI em relação ao OP (Figura 24 A-C).

4.5.3- Hormônio 11-cetotestosterona

Não foram encontradas diferenças estatísticas do hormônio 11-cetotestosterona (11KT) ao longo dos 90 dias experimentais no grupo operado testemunho ($P = 0,994$) e no grupo MT + AI ($P=0,3537$). No grupo AI houve uma diminuição significativa ($P= 0,021$) das concentrações plasmáticas de 11KT com 30 e 60 dias após o início dos experimentos, retomando os valores iniciais aos 90 dias. A mesma redução da concentração plasmática de 11 KT foi observada aos 30 e 60 dias no grupo de tratamento MT ($P= 0,032$), no entanto estes valores se mantiveram reduzidos após 90 dias (Figuras 25 A-D).

Ao verificar o perfil plasmático de 11KT nos grupos de tratamentos pode-se observar uma diminuição significativa ($P= 0,0131$) nos grupos AI e MT após 30 dias experimentais em relação aos grupos OP e MT + AI. Com 60 e 90 dias

experimentais não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (P= 0,195 e P= 0,323, respectivamente) (Figura 26 A-C).

5- Discussão

Na literatura os termos “inversão” e “reversão” de sexo são conflitantes. Nesse trabalho foi utilizado o termo de acordo com Lone *et al.* (2001), que definem como *inversão* o processo de mudança do sexo que ocorre quando um indivíduo muda para o sexo oposto, passando por uma fase transicional (intersexo), enquanto a *reversão* acontece quando o indivíduo caminha para o intersexo, porém, mais tarde, retorna para o sexo inicial. No entanto, pode-se dizer que nos resultados obtidos com *E. marginatus* ocorreu um processo de *inversão* sexual passando por uma fase de intersexo.

Segundo Vazzoler (2006) as gônadas das fêmeas tendem a ter uma massa mais elevada por apresentar a deposição da vitelogenina, sendo este evento necessário para o crescimento e maturação das células germinativas femininas. Nos machos, esse pronunciado aumento da massa corpórea e correlação direta com o grau de maturação gonadal não ocorre, principalmente por não haver a deposição de substratos energéticos de forma tão intensa e, além disso, nas células germinativas masculinas ocorrem divisões celulares e redução do tamanho dos gametas ao longo da espermatogênese (Grier & Taylor, 1998). Essa correlação da maturação dos gametas explica a notória diminuição do índice gonadossomático (IGS) nos grupos experimentais, evidenciado pelas análises histológicas gonadais de *E. marginatus*. A degeneração do tecido gonadal do primeiro sexo (ovários) e o crescimento e maturação do tecido gonadal do sexo oposto (testículos), implica em uma redução da massa gonadal, haja vista a redução do tamanho dos gametas masculinos ao longo da maturação. Esta evidência foi marcante nos animais

tratados com MT e MT + AI, corroborando os dados das análises morfológicas que mostram que, nestes tratamentos, o avanço da espermatogênese foi maior.

Nos animais intersexo diversos eventos simultâneos são encontrados: aparente desorganização da arquitetura gonadal padrão; massiva degeneração das células germinativas femininas; presença de centros melanomacrofágicos; proliferação de estruturas associadas ao sexo masculino (tecido intersticial e células germinativas masculinas); e a maturação das células germinativas masculinas. Através de técnicas de microscopia eletrônica, diversos autores relatam outras estruturas e eventos que são encontrados durante o referido processo, como: o aparecimento e intensa proliferação das células de Leydig, células mióides, e a presença de estruturas que provavelmente estão relacionadas com a remoção e reabsorção de restos teciduais (granulócitos, melanomacrófagos e macrófagos) (Sadovy & Shapiro, 1987; Besseau & Bruslé-Sicard, 1991; Grier & Taylor, 1998; Antoneli, 2006).

Nas análises histológicas das gônadas de *E. marginatus*, dos animais utilizados no grupo inicial e operado testemunho, ficou evidente que o desenvolvimento oocitário evolui somente até o crescimento primário em fase de perinucleolar, o qual era o esperado para animais imaturos, segundo Andrade *et al.* (2003), que estudaram a reprodução desta espécie no litoral brasileiro, e relatando que nos animais imaturos são encontrados apenas os tipos celulares descritos anteriormente.

Estudos mais recentes realizado por Alam *et al.* (2006), investigando as células produtoras de esteróides (CPE), supostas células de Leydig, por imunohistoquímica dos citocromos P450scc (enzima inicial na etapa da

biossíntese dos hormônios esteróides) e o citocromo P450 11 β (enzima na etapa final da síntese de 11KT) (ver figura 27) no ovário de *E. coioides* mostrou células aglomeradas fortemente imunopositivas ao anticorpo P450scc e P450 11 β durante o ciclo reprodutivo anual em tecidos próximos aos vasos sanguíneos na cápsula do ovário, circundando toda a periferia do ovário. Essas células identificadas por Alam *et al.* (2006) são iguais as que foram encontradas para *E. marginatus* neste estudo, sendo observado um aumento desses aglomerados celulares na cápsula gonadal nos animais com as gônadas revertidas.

Em machos, o andrógeno 11-cetotestosterona (11KT) específico para teleosteos, inicia um papel fundamental na maturação sexual, no desenvolvimento de caracteres sexual secundários, no comportamento reprodutivo (Borg, 1994) e na mudança de sexo em hermafroditas protogínicos (Alam *et al.*, 2006). O estudo do papel funcional dos andrógenos em fêmeas (Senaha *et al.*, 2003) indica que a 11KT produzida no ovário deve estar envolvida no controle do crescimento dos oócitos pré-vitelogênicos (Matsubara *et al.*, 2003). Yeh *et al.* (2003) aplicou baixas doses de metiltestosterona em fêmeas de *E. coioides* e verificou que o IGS aumentou nestes animais e os oócitos estavam em fase vitelogênica mais avançada que os animais do grupo que não receberam o andrógeno, presumindo que, alternativamente esses andrógenos exógenos poderiam ter sido aromatizados a estrógenos.

Esses resultados, principalmente os encontrados por Alam *et al.* (2006), sugerem que os aglomerados de células produtoras de esteróides próximas aos vasos sanguíneos têm um possível papel fisiológico no crescimento do oócito e na reestruturação gonadal durante a mudança de sexo nos indivíduos

hermafroditas protogínicos. Porém, estudos relacionando a 11KT e seus receptores são necessários para um melhor entendimento dos andrógenos no desenvolvimento do ovário e na inversão sexual em hermafroditas sequenciais protogínicos.

Nas gônadas das espécies hermafroditas sequencias, a diferenciação das células germinativas iniciais pode ser simultânea àquelas do segundo sexo – ou seja, as células germinativas correspondentes ao segundo sexo permanecem “dormentes” até o momento da inversão – ou a diferenciação ocorre apenas durante a mudança de sexo, a partir de um estoque permanente de células-tronco (*stem cells*) (Reinboth, 1983; Bruslé-Sicard *et al.*, 1994). Em algumas espécies, um número variável de células germinativas imaturas do segundo sexo pode ser encontrado imerso na matriz gonadal do primeiro sexo ou agrupado em uma região contígua à própria gônada (Smith, 1965; Sadovy & Shapiro, 1987), enquanto em outras, nenhuma célula germinativa do segundo sexo é reconhecível na gônada funcional do primeiro sexo (Shapiro, 1987).

Sarter *et al.* (2006) estudando a inversão sexual em *E. marginatus* relataram que os ovários de animais jovens apresentam cistos de células germinativas indiferenciadas no compartimento germinativo. No presente estudo este mesmo tipo celular foi encontrado, no entanto, esses cistos de células germinativas foram caracterizados como oócitos em cromatina nucleolar leptotênico na primeira fase da meiose, de acordo com estudo recente investigando a ultra-estrutura das células germinativas realizado por Mazzoni (2009) com *Cyprinus carpio*.

Nas espécies de hermafroditas sequencias a inversão sexual em ambiente natural ocorre espontaneamente (Lone *et al.*, 2001), e é controlada

por fatores genéticos, fisiológicos e comportamentais (Devlin & Nagahama, 2002; Munoz & Waner, 2003; Perry & Grober, 2003), podendo ser decorrente de influências do comportamento social (ex.: estímulos sócio-demográficos) (Shapiro, 1987; Robertson & Justines, 1982), individual (Shapiro, 1987), podendo ser também induzida por hormônios em sistemas de cativeiro (Reinboth & Bruslé-Sicard, 1997; Glamuzina *et al.*, 1998; Marino *et al.*, 2000; Bhandari *et al.*, 2003, 2004; Sanches *et al.*, 2009). Existem ainda espécies em que alguns indivíduos podem mudar de sexo sob determinadas condições ambientais, como poluição, estresse ou alterações na temperatura da água e no fotoperíodo (Warner, 1982).

O esquema proposto na figura 28 simboliza como as influências dos estímulos sócio-demográficos podem controlar a mudança de sexo nos indivíduos hermafroditas sequenciais no ambiente natural. Na figura 28 (A) estão representadas as agregações que segundo Shapiro (1987) ocorrem durante o período reprodutivo; a figura 28 (B) demonstra a ausência do macho na população durante o período reprodutivo e em consequência desta ausência (figura 32 C), algum estímulo gerado no período reprodutivo induz a inversão sexual das fêmeas dominantes para o próximo período reprodutivo.

Para que a inversão sexual ocorra com sucesso, todos os fatores relatados anteriormente, que modulam a mudança de sexo nos indivíduos hermafroditas protogínicos, dependem da integração das estruturas que formam o eixo hipotálamo – hipófise – gônadas (Figura 29). Este eixo exerce, através de complexas vias de *feedback* hormonais, funções que desencadeiam a liberação das gonadotropinas adenohipofisárias (FSH e LH), e consequentemente, a produção dos esteróides gonadais, que modulam a

desestruturação e degeneração do tecido gonadal do primeiro sexo, e o aparecimento, proliferação e maturação das estruturas relacionadas ao segundo sexo.

O padrão de expressão de FSH e LH têm sido investigados em muitos teleósteos, e diferentes padrões têm sido revelados em diferentes espécies de peixes. O padrão mais comum está em salmonídeos, nos quais se observam altos níveis plasmáticos de FSH durante o início da gametogênese, diminuindo durante a vitelogênese e maturação, aumentando novamente durante o período pré-ovulatório, enquanto que o LH é indetectável durante a gametogênese, somente aumentando um pouco antes da ovulação/espermição (Swanson *et al.*, 1991; Slater *et al.*, 1994). Um segundo padrão de expressão foi descrito por Han *et al.* (2003) em fêmeas selvagens de *Anguilla japonica*. A expressão de RNAm de ambos FSH e LH foram detectável em juvenis, aumentando ainda mais nos adultos, e os níveis de expressão de LH foram significativamente maiores que o FSH durante espermatogênese. O terceiro padrão de expressão foi descrito em *Sparus aurata*, com expressões similares de ambas gonadotropinas durante todo o ciclo reprodutivo (Elizur *et al.*, 1998). Em *Hippoglossus hippoglossus* foi encontrado o quarto padrão de expressão, mostrando altos níveis de expressão de FSH e LH na hipófise de machos adultos, enquanto que em juvenis o FSH não foi detectado e o LH foi encontrado com níveis muito baixos de expressão (Weltzien *et al.*, 2004). O quinto perfil foi revelado Mateos *et al.* (2003), em *D. labrax*, mostrando que os níveis LH e FSH foram aumentando a expressão na hipófise paralelamente do início até a gametogênese final, e rapidamente todos os níveis declinam após a espermição/ovulação.

Em fêmeas de *Epinephelus coioides*, Li *et al.* (2005) observaram um sexto padrão de expressão das gonadotropinas, com um nível muito baixo de expressão de LH e FSH no ovário em repouso e altamente expressos durante o desenvolvimento do ovário, sugerindo que as gonadotropinas podem ser um regulador do desenvolvimento gonadal em *groupers*.

Um estudo recente com intuito de elucidar ainda mais o envolvimento do eixo hipotálamo – hipófise – gônadas no processo de mudança de sexo em teleósteos, mostrou o envolvimento das gonadotropinas na inversão sexual de *Epinephelus merra* (Kobayashi *et al.*, 2010) implantados com FSH e LH purificado de bovinos. Estes autores relatam que com estes implantes de gonadotropinas, foi obtida a inversão sexual completa dos animais em três semanas. Kobayashi *et al.* (2010) relataram que em fêmeas de *E. merra* os níveis de expressão do FSH na hipófise são baixos. Entretanto, durante o desenvolvimento dos testículos os níveis de expressão de FSH na hipófise aumentaram dramaticamente, e os níveis de expressão de LH não tiveram diferenças significantes durante a inversão sexual induzida com FSH e LH purificado de bovinos. Desta forma, esses autores sugerem que o FSH pode ser o gatilho na inversão sexual nas garoupas.

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, podemos ressaltar a ação do FSH durante a inversão sexual e corroborar com os resultados obtidos por Kobayashi *et al.* (2010), pois nos animais do grupo de tratamento com AI após 90 dias de tratamento, as marcações do anticorpo para FSH foram fracas (pouca intensidade de marcação) e esta relação não foi observada nos demais grupos experimentais. No entanto, confrontando-se esses resultados de análises imunohistoquímicas da hipófise com as análises histológicas das

gônadas do grupo tratado inibidor de aromatase, verifica-se que este grupo demonstrou um processo de inversão sexual pouco avançado (animais intersexo) quando comparados com os animais que receberam o tratamento com metiltestosterona. Desta forma, podemos sugerir que a imunomarcção do FSH em menor intensidade no grupo AI foi devido a uma maior liberação deste peptídeo, haja vista que existe um requerimento maior de FSH no início de uma transição de sexo para macho. Entretanto estudos mais detalhados ao longo dos 90 dias de transição gonadal em *E. marginatus* precisam ser realizados para constatar o real envolvimento do FSH na inversão do sexo.

Estudos similares ao de Kobayashi *et al.* (2010) demonstraram o aumento dos níveis de expressão de FSH associados com o uso de metiltestosterona na indução a inversão sexual de *E. coioides* (Zhang *et al.*, 2007). De forma geral as células gonadotrópicas hipofisárias apresentam receptores para os esteróides gonadais que modulam assim a produção de FSH e LH (Klenke & Zohar, 2003). Desta forma, a utilização de substâncias que mimetizam (metiltestosterona) a ação de esteróides ou alteram a via de produção (inibidores de aromatase) poderiam alterar o padrão de funcionamento das alças de *feedback* negativo, mudando as respostas de produção das gonadotropinas. Os inibidores de aromatase atuam de maneira competitiva com o substrato pelo o sítio de ligação da enzima P450aromatase, evitando a formação do complexo enzima-substrato (testosterona), que resultaria no produto (17 β - estradiol) (Figura 30).

O resultado obtido no perfil plasmático dos esteróides gonadais ao longo dos 90 dias experimentais do presente estudo demonstrou que o E₂ aumenta durante o início da inversão sexual e diminui após a inversão avançada dos

animais tratados com o andrógeno. Já a T aumenta no início da reestruturação gonadal dos animais tratados com os andrógenos e com o inibidor de aromatase, e que, quando a gônada apresentava inversão mais avançada o pico da testosterona diminuiu. Observando-se as concentrações plasmáticas do andrógeno 11KT, os dados mostram que nos animais tratados com AI, a queda final na concentração de testosterona está associada a um aumento da concentração de 11KT, o andrógeno efetivo na maioria das espécies de peixes, nas quais é importante na proliferação de espermatogônias e espermiogênese, sendo ativo na retomada da meiose (Schulz & Miura, 2002). Desta forma, estes resultados de baixa imunomarcagem do de FSH nos animais em fase de intersexo sugere que este aumento do E₂ e testosterona (T) no início da inversão sexual seja eventualmente comandada pela a liberação do FSH para atuação nos receptores gonadais.

Nos grupos tratados com andrógenos (MT e MT + AI) a queda na concentração de testosterona aos 90 dias de experimento também ocorreu, no entanto as elevações de 11 KT não foram observadas, sugerindo que nestes animais, a produção de gametas masculinos ocorreu principalmente devido à ação do andrógeno sintético.

Correlacionando-se as alças de *feedback* no eixo hipotálamo – hipófise gônadas durante a maturação gonadal é conhecido que o aumento dos níveis de E₂ no plasma ocasiona um *feedback* negativo informando a hipófise a diminuir a liberação de FSH e aumentar a liberação do LH para a maturação final. No entanto, pode-se sugerir que a intensa imunomarcagem do LH na hipófise de *E. marginatus* ocorreu por falta do aumento nos níveis plasmáticos de E₂ que por sua vez iria promover o *feedback* negativo estimulando a

liberação de LH, e conseqüentemente a espermiogênese não pode ser completa por falta da liberação do LH e sua ação nos receptores gonadais para estimular uma maior síntese de 11-KT. Este processo pode ser confirmado pela ausência de elevação da concentração de 11 KT nos grupos onde o MT foi administrado, grupos estes em que a concentração plasmática de estradiol foi efetivamente reduzida ao longo do processo de inversão.

A análise conjunta dos esteróides gonadais nos grupos experimentais mostra que nos animais tratados com AI, como não houve diminuição na concentração do estradiol aos 90 dias, a alça de *feedback* negativo provavelmente foi acionada, a produção de FSH diminuiu, o que causou o aumento da concentração plasmática de 11KT. Já nos grupos onde o MT foi administrado, a diminuição na concentração de estradiol após o tratamento, reduziu a ação do *feedback* negativo na hipófise. É importante ressaltar que o entendimento exato destas relações entre as gonadotropinas hipofisárias e a concentração plasmática dos esteróides gonadais só será possível através de análises mais precisas sobre a real condição de produção destas gonadotropinas, como por exemplo, com análises de expressão gênica.

Nesse estudo, as análises imunohistoquímicas das células gonadotrópicas de *E. marginatus* foram conduzidas com sucesso utilizando-se anticorpos de salmão. As células gonadotrópicas de *E. marginatus* são mais reativas ao β -LH de salmão do que ao β -FSH de salmão. Com β -FSH de salmão, as secções histológicas apresentam mais reação de fundo (*background*) do que com o anticorpo anti β -LH, apesar das reações terem seguido juntas, com o mesmo protocolo, e várias diluições dos anticorpos terem sido testadas.

Quanto à distribuição das células gonadotrópicas imunoreativas nas regiões adenohipofisárias, PPD e PI os resultados obtidos mostram-se semelhantes com outros teleósteos já investigados (Cambré *et al.*, 1986; García-Hernández *et al.*, 1996; Vissio *et al.*, 1997; Segura-Noguera *et al.*, 2000; Cala *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 2003). Cambré *et al.* (1986), atribuem a localização das células gonadotrópicas na PI como uma projeção da PPD em consequência da grande quantidade de células gonadotrópicas durante a maturação gonadal.

Quanto à questão relacionada à produção de FSH e LH em uma única célula, ou seja, a dualidade das células gonadotrópicas foi demonstrado que as células produtoras de FSH e LH são distintas na hipófise de *E. marginatus*. Li *et al.* (2005), realizaram uma coloração de imunofluorescência dupla de FSH e LH, e revelaram que a expressão LH e FSH são em distintas células na área da PPD de *E. coiodes*.

A imunomarcção das células gonadotrópicas em *E. marginatus* mostrou a marcação das células produtoras de FSH e LH indistintamente na PPD e PI. Em *E. coiodes* as células de FSH imunomarcadas foram principalmente distribuídas no meio da região da PPD, enquanto que as células de LH incluiu a área similar de localização das células de FSH e também na periferia da hipófise, próximo a região da PI (Li *et al.*, 2005). Em comparação com as células de FSH, as células de LH foram mais imunomarcadas e amplamente distribuídas (Li *et al.*, 2005), sendo esse mesmo padrão encontrado também para *E. marginatus*.

Em *E. merra*, Kobayashi *et al.* (2010) não detectaram as células de FSH imunoreativas em fêmeas imaturas. Em contraste, células imunoreativas ao

anti FSH foram encontradas ao redor da neuro-hipófise durante a mudança de sexo e em machos maduros, e as células imunoreativas ao anti LH foram observadas na região da PPD e PI em todas as fases do ciclo reprodutivo. Em ambos os sexos as células de LH de *E. merra* (Kobayashi *et al.*, 2010) e em *E. marginatus*, no presente estudo, foram numerosas e amplamente localizadas na PPD. Em outra espécie de garoupa, *E. coiodes*, as gonadotropinas foram recentemente estudadas, e ambas células de FSH e LH foram identificadas imunohistologicamente na hipófise de fêmeas e aparentemente são similarmente abundantes (Zhang *et al.*, 2007). Um número maior de análises comparativas investigando o papel e a expressão de FSH e LH são necessárias para as espécies de garoupas, de forma a definir quais seriam as variações existentes nessas diferentes espécies.

Em relação à imunomarcagem das células gonadotrópicas encontradas no presente trabalho na região da PI, esta localização foi confirmada pela imunomarcagem das células produtoras de SL, que se mostraram fortemente imunorreativas com o anticorpo de salmão e distribuídas ao redor dos ramos da neuro-hipófise, assim com relatado por Honji (2007) em *Salminus hilarii* e em diversos trabalhos com teleósteos. O hormônio SL foi descoberto recentemente (Rand-Weaver *et al.*, 1991) e até o momento só foi encontrado em peixes (Kawauchi & Sower, 2006). No entanto, o verdadeiro papel fisiológico em peixes ainda continua desconhecido, mas algumas evidências indicam que este hormônio esteja ligado em alguns processos fisiológicos, tais como: no metabolismo, na regulação ácido-básica e osmorregulação (Kakizawa *et al.*, 1995; Kaneko, 1996), no desenvolvimento embrionário (Laiz-Carrión *et al.*,

2003), no estresse (Kaneko, 1996), na reprodução (Johnson *et al.*, 1997) e na produção de esteróides sexuais (Planas *et al.*, 1992).

Com a utilização da imuno-histoquímica os resultados restringem-se a demonstrar o acúmulo dos grânulos de FSH ou LH que estão, no momento da coleta das hipófises, acumulados nas células gonadotrópicas, não permitindo discutir muitos pontos relacionados à síntese ou degradação. Um possível aumento da imunomarcagem poderia estar relacionado tanto a uma maior produção do hormônio em questão, como uma menor liberação deste hormônio para a circulação. No caso da metiltestosterona, que foi o tratamento que levou a um estágio de espermatogênese mais avançado, seria esperada uma redução na produção das gonadotropinas, já que desde a década de 70 já se conhece que em mamíferos, na maioria dos tecidos-alvo a metiltestosterona converte-se em 5-alfa-testosterona que inibe a liberação de LH e FSH mediante um mecanismo de retroalimentação negativa exercido sobre a hipófise e o hipotálamo (Camerino & Sciaky, 1975). Por outro lado, em peixes, um estudo recente com *Clarias gariepinus* foi demonstrado que em fêmeas adultas a administração de MT aumenta a imuno-marcagem de células produtoras de LH (Swapna & Senthilkumaran, 2009).

De uma forma geral, em peixes, estudos com expressão gênica demonstram que os níveis de mRNA de LH em *goldfish* imaturos são estimulados pela ação de testosterona, indicando que este andrógeno age diretamente nas células gonadotrópicas hipofisárias, com efeitos estimulatórios na síntese de LH (Sohn *et al.*, 2001). Em exemplares imaturos de truta arco-íris também já é bem conhecido o papel da testosterona em estimular a expressão gênica de LH (Huang *et al.*, 1997). Por outro lado, analisando-se exemplares

adultos de *goldfish* alterações nos níveis de expressão gênica de LH não foram detectadas ao longo das diferentes fases do ciclo reprodutivo quando os animais foram injetados com testosterona (Xiong *et al.*, 1994). Adicionalmente, Huggard *et al.* (1996) também não encontraram efeitos da testosterona nos níveis de expressão de LH de trutas e *goldfish* maduros, quando tratados com doses fisiológicas.

Estas informações sugerem que os efeitos dos andrógenos na modulação da produção de gonadotropinas são menos efetivos com o avanço da maturação, o que pode de certa forma explicar a ausência de variações na imuno-marcação das células produtoras de gonadotropinas (principalmente do LH) em *E. marginatus* tratados com metiltestosterona, dada a evolução da espermatogênese ocorrida nos animais deste grupo experimental. No entanto, não podemos descartar a possibilidade da técnica de imuno-marcação, por não ser adequada do ponto de vista quantitativo, traduzir possíveis alterações e sugerimos que estudos de expressão gênica poderiam ser conduzidos para continuar a investigação destes hormônios.

Neste experimento optou-se por implantar alguns animais com o andrógeno 17-alfa-metiltestosterona, já que Sanches *et al.*, (2009) e Cabrita *et al.* (2009) observaram um efeito positivo deste andrógeno na inversão sexual de *E. marginatus*, mas os aspectos morfofisiológicos não haviam sido abordados. O uso do andrógeno 17-alfa-metiltestosterona foi importante também para certificarmos que o veículo e o local de implantação foram adequados para a metabolização do implante, já que a inversão sexual de *E. marginatus* já foi verificada com este andrógeno. Já o grupo tratado com AI + 17 alfa-metiltestosterona foi estabelecido, pois como os animais são jovens,

questionamos que apenas o AI poderia não ser suficiente para a inversão sexual (visto que a quantidade de esteróides ainda é basal em animais imaturos), e assim uma pequena dose suplementar de testosterona pudesse ser adequada à inversão sexual. Foi observado que mesmo usando metade da dose os eventos ocorridos nas gônadas evidenciaram uma inversão sexual mais adiantada quando comparada com os animais do grupo implantado apenas com inibidor de aromatase e iguais aos grupos que receberam apenas o andrógeno. Porém, para afirmar que essa pequena dose suplementar de andrógeno foi capaz de promover a inversão sexual mais avançada do que o grupo de inibidor de aromatase são necessários mais estudos com doses inferiores de metiltestosterona.

De uma forma geral a interpretação das análises histológicas gonadais, demonstra que a utilização dos inibidores de aromatase em *E. marginatus* desencadeia os eventos morfológicos relacionados à inversão sexual de hermafroditas protogínicos, no entanto a dose utilizada, o período de ação ou até mesmo a via de aplicação precisam ser otimizadas. No caso dos animais implantados com metiltestosterona foi possível observar um grau mais avançado de espermatogênese, porém os animais não chegaram a produzir uma grande quantidade de espermatozóides, e assim, atingir uma espermiogênese completa.

Segundo Segatelli *et al.* (2009), na rã touro a duração de todo processo de espermatogênese é de 40 dias e a espermiogênese seria entre 7 dias. França & Russell (1998), relatam que para mamíferos esse tempo é similar, e Schulz *et al.* (2010) relatam que o tempo de desenvolvimento das células germinativas de peixes são semelhantes para todos os vertebrados. Essas

informações nos levam à hipótese de que certamente devido à questão de alguns dias ou no máximo 1 semana após o término do procedimento experimental, poderíamos ter observado uma maior quantidade de espermatozoides.

6- Conclusões

- 1) Em animais jovens de *Epinephelus marginatus* a inversão sexual mostrou-se mais eficiente com o uso de andrógenos sintéticos (metiltestosterona). O uso de inibidores de aromatase pode ser considerado funcionalmente viável, no entanto, para que a inversão completa do sexo seja obtida, com maior produção de espermatozóides, ajustes de protocolos devem ser considerados;
- 2) O uso de doses mistas (inibidores de aromatase e metiltestosterona) deve ser reavaliado experimentalmente, assim como propostas de doses inferiores de metiltestosterona, reduzindo assim os efeitos de *feedback* negativo deste andrógeno sintético na hipófise e no hipotálamo;
- 3) Nas gônadas das *E. marginatus* a diferenciação das células germinativas iniciais ocorre apenas durante a mudança de sexo, a partir de um estoque permanente de células-tronco (*stem cells*);
- 4) Nas análises histológicas gonadais, durante a inversão sexual, foram observados os seguintes eventos: aparente desorganização da arquitetura gonadal padrão; massiva degeneração das células germinativas femininas; presença de centros melanomacrofágicos; proliferação de estruturas associadas ao sexo masculino (tecido intersticial e células germinativas masculinas); e a maturação das células germinativas masculinas;
- 5) A imunomarcação do FSH ocorreu em menor intensidade no grupo AI, possivelmente devido a uma maior liberação desse peptídeo na transição de sexo. Entretanto, estudos mais detalhados ao longo dos

90 dias de transição gonadal em *E. marginatus* precisam ser realizados para constatar o real envolvimento do FSH na inversão do sexo;

- 6) A imunomarcção das células gonadotrópicas em *E. marginatus* mostrou a presença das células produtoras de FSH e LH na região da PPD e PI. Em comparação com as células de FSH, as células de LH foram predominantes e amplamente distribuídas, não apresentando a dualidade das células;
- 7) A análise conjunta dos esteróides gonadais nos grupos experimentais mostra que nos animais tratados com AI, como não houve diminuição na concentração do estradiol aos 90 dias, a alça de *feedback* negativo provavelmente foi acionada, a produção de FSH diminuiu, permitindo o aumento da concentração plasmática de 11KT, via ação do LH. Já nos grupos onde o MT foi administrado, a diminuição na concentração de estradiol após o tratamento, reduziu a ação do *feedback* negativo na hipófise e conseqüentemente a produção de LH para o desencadeamento das fases finais da espermiogênese;
- 8) Devido ao curto período de tempo do processo de espermiogênese, as informações obtidas durante as análises histológicas gonadais nos levam à hipótese de que certamente em alguns dias ou no máximo 1 semana após o término do procedimento experimental, poderíamos ter observado uma maior quantidade de espermatozóides, e assim uma liberação de sêmen nos animais tratados com andrógenos.

7- Referências Bibliográficas

- AFONSO, L. O. B. WASSERMANN, G. J., OLIVEIRA, T. R. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. *Journal of Experimental Zoology*, 290: 177-18, 2001.
- ALAM, M. A., BHANDARI, R. K., KOBAYASHI, Y., SOYANO, K., NAKAMURA, M. Induction of sex change within two full moons during breeding season and spawning in grouper. *Aquaculture*, 255: 532–535, 2006.
- ANDRADE, A. B., MACHADO, L. F., HOSTIM-SILVA, M., BARREIROS, J. P. Reproductive Biology of the Dusky Grouper *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46: 373-381, 2003.
- ANTONELI, F. N. Perfil morfo-funcional da inversão de sexo em SYNBRANCHIDAE (TELEOSTEI: SYNBRANCHIFORMES). Campinas, Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. 164, 2006.
- ATZ, J. W. Intersexuality in Fishes. In: Intersexuality in vertebrates including man. C.N. ARMSTRONG and A.J. MARSHALL (eds.). London: Academic Press, 145-232, 1964.
- BARREIROS, J. P. Sexual inversion in *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces: Serranidae, Epinephelinae) nos Açores. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 5: 81-90. 1998
- BESSEAU, L., BRUSLÉ-SICARD, S. Sex inversion in a protandric hermaphrodite *Lithgnathus mormayrus* (L., 1758) (Teleostei, Sparidae): histocytological peculiarities. In: *INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH*, 4, Sheffield. Proceedings. Sheffield: Fish., 95, 1991.
- BHANDARI, R. K., KOMURO, H., MIKIHICO, H. MASSARU, N. Sex inversion of sexually immature honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by aromatase inhibitor. *Zoological Science*, 21: 305-310, 2004.
- BHANDARI, R.K., KOMURO, H., NAKAMURA, S., HIGA, M., NAKAMURA, M. Gonadal restructuring and correlative steroid hormone profiles during

- natural sex change in protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). *Zoological Science*, 20: 1399–1404, 2003.
- BORG, B. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109: 219-245, 1994.
- BRASIL. Instrução Normativa no 05, de 21 de maio de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Ministério do Meio Ambiente, 136-142, 2004.
- BRUSLÉ-SICARD, S., FOURCAULT, B. Recognition of Sex-inverting protandric *Sparus aurata*: ultrastructural aspects. *Journal Fish Biology*, 50: 1094-103, 1997.
- BRUSLÉ-SICARD, S., REINBOTH, R., FOURCAULT, B. Germinal potentialities during sexual state changes in a protandric hermaphrodite, *Amphiprion frenatus* (Teleostei, Pomacentridae). *Journal Fish Biology*, 45: 597-611, 1994.
- CABRITA, E., ENGROLA, S., CONCEIÇÃO, L. E. C., POUSÃO-FERREIRA, P., DINIS, M. T. Successful cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. *Aquaculture*, 287: 152-157, 2009.
- CALA, F. S., PORTILLO, A., MARTÍN DEL RÍO, M. P., MANCERA, J. M. Immunocytochemical characterization of adenohipophyseal cells in the greater weever fish (*Trachinus draco*). *Tissue & cell*, 35: 169-178, 2003.
- CAMBRÉ, M.L., VERDONCK., OLLEVIER, F., VANDESANDE, F. BATTEN, T. F. C., KUHN, E. R. Immunocytochemical identification and localization of the different cell types in the pituitary of seabass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology*, 61: 368-375, 1986.
- CAMERINO, B., SCIAKY, R. Structure and effects of anabolic steroids. *Pharmacology Therapy B*, 1: 233-275, 1975.
- CARDWELL, J. R., LILEY, N. R. Hormonal control of sex and color change in the Stoplight Parrotfish, *Sparisoma viride*. *General and Comparative Endocrinology*, 81: 7-20, 1991.

- CARREAU, S., BOURGUIBA, S., LAMBARD, S., GALERAUD-DENIS, I., GENISSEL, C., LEVALLET, J. Reproductive system: aromatase and estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 193: 137-143, 2002.
- CHAN, S. T. H. Natural sex reversal in vertebrates. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, 259: 59-71, 1970.
- CHAN, S. T. H., YEUNG, W. S. B. Sex control and sex reversal in fish under contions. In W.S. HOAR, D. J. RANDALL and F. M. DONALDSON (eds.). *Fish Physiology IX B, reproduction, behavior and fertility control*. New York: Academic Press, 171-222, 1983.
- CHAN, S. T. H., YEUNG, W. S. B. Sex steroids in intersexual fishes. *Fish Physiology Biochemistry*, 7: 229-235, 1989.
- CHANG, C. F., LAU, E. L., LIN, B.Y. Stimulation of spermatogenesis or of sex reversal according to the dose of exogenous estradiol-17 β in juvenile males of protandrous Black Porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *General and Comparative Endocrinology*, 100: 355-367, 1995.
- CHANG, C. F., LEE, M. F., CHEN, G. R. Estradiol-17 β associated with the sex reversal in protandrous Black Porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Journal of Experimental Zoology*, 268: 53-58, 1994.
- CHAUVET, C. Calcul par otolimetrie de La relation long. T – Age d'*Epinephelus guaza* (Linnaeus, 1758) de La Côte Nord de La Tunisie. *Rapport de La Commission Internationale de La Mer Méditerranée*, 27: 103-106, 1981.
- CONNAUGHTON, M. A., AIDA, K. Female reproductive system in fish. In: E. KNOBIL and J. D. NEILL (eds.). *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press, 2: 193-214, 1998.
- DEVLIN, R. H., NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: na overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191-364, 2002.
- DU, J. L., LEE, Y.H., YUEH, W.S. CHANG, C.F. Seasonal Profiles of Brain and Pituitary Gonadotropin-Releasing Hormone and Plasma Luteinizing Hormone in Relation to Sex Change of Protandrous Black Porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Biology of Reproduction*, 72: 922–931, 2005.

- ELIZUR A, M. I., ROSENFELD, H., ZMORA, N., KNIBB, W. R., ZOHAR, Y.,
Seabream gonadotropins: sexual dimorphism in gene expression.
Proceeding of the 5th International Symposium on Reproductive
Physiology of Fish, Austin, Texas, 13-15, 1998.
- FEIST, G., SCHRECK, C. B., FITZPATRICK, M. S., REDDING, J. M. Sex
steroid profiles of coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*) during early
development and sexual differentiation. *General and Comparative
Endocrinology*, 80: 299-313, 1990.
- FOSTIER, A., JALABERT, B., BILLARD, R., BRETON, B., ZOHAR, Y. The
gonadal steroids. *In*: W. S. Hoar, D. J. Randall and E.M. Donaldson (eds.)
Fish Physiology. New York: Academic Press, 9: 277-372, 1983.
- FRANÇA, L. R., OGAWA, T., AVARBOCK, M. R., BRINSTER, R. L., RUSSELL,
L. D. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis.
Biology of Reproduction, 59: 1371-7, 1998.
- FRANCIS, R. C. Sexual lability in teleosts: developmental factors. *The quarterly
Review of Biology*, 67: 1-17, 1992.
- GARCIA-HERNÁNDEZ, M. P., GARCÍA-AYALA, A., ELBAL, M. T.,
AGULLEIRO, B. The adenohypophysis of Mediterranean yellowtail *Seriola
dumerilli* (Risso, 1810): an immunocytochemical study. *Tissue & Cell*, 28 :
577-585, 1996.
- GLAMUZINA, B., SKARAMUCA, B., GLAVIC, N., KOZUL, V. Preliminary
studies on reproduction and early life stages in rearing trial with dusky
grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Aquaculture Research*,
29: 769-771, 1998.
- GRIER, H. J., TAYLOR, R. G. Testicular maturation and regression in the
common snook. *Journal Fish Biology*, 53: 521-542, 1998.
- GRIER, H. J., URIBE. M.C. The testis and spermatogenesis in teleosts. In
Jamieson, B.J.M (Ed): *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes
(Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity
Spermatozoa*, 802, 2009.

- GRIER, H. J., URIBE, M.C., PATIÑO, R. The ovary, folliculogenesis and oogenesis in teleosts. In Jamieson, B.J.M (Ed): *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa*, 802, 2009.
- GRIER, H. Ovarian Germinal Epithelium and Folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *Journal of Morphology*, 243: 265–281, 2000.
- HAN, Y. S., LIAO, I. C., HUANG, Y. S., HE., J. T., CHANG, C. W., TZENG, W. N. Synchronous changes of morphology gonadal development of silvering Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 219: 783-796, 2003.
- HEEMSTRA, P. C., & RANDALL, J.E. FAO species catalogue. Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). *FAO, Rome*, 16: 382, 1993.
- HONJI, R. M. Caracterização endócrina durante o ciclo reprodutivo da tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae), em três ambientes distintos: natural, impactado e cativo. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 2007.
- HUANG, Y. S., SCHMITZ, M., L. E., BELLE, N., CHANG, C. F., QU'ERAT, B., DUFOUR, S., Androgens stimulate gonadotropin-II_ subunit in eel pituitary cells in vitro. *Molecular Cellular Endocrinology*, 131: 157-166, 1997.
- HUGGARD, D., KHAKOO, Z., KASSAM, G., MAHMOUD, S. S., HABIBI, H. R. Effect of testosterone on maturational gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels in the goldfish pituitary. *Biology Reproduction*, 54: 1184-1191, 1996.
- IWAMATSU, T. Convenient method for sex reversal in a freshwater teleost, the Medaka. *Journal of Experimental Zoological*, 283: 210-214, 1999.
- JOHNSON, A. K., THOMAS, P., WILSON, R. R. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. *Journal Fish Biology*, 52: 502-518, 1998.

- JOHNSON, L. L., NORBERG, B., WILLIS, M. L., ZEBROSKI, H., SWANSON. Isolation, characterization and radioimmunoassay of Atlantic halibut somatolactin and plasma levels during stress and reproduction in flatfish. *General and Comparative Endocrinology*, 105: 194-209, 1997.
- KAKIZAWA, S., KANEKO, T., OGASAWARA, T., HIRANO, T. Changes in plasma somatolactin levels during spawning migration of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 14: 93-191, 1995.
- KANEKO, T. Cell biology of somatolactin. *International Review of Cytology*, 164: 1-24, 1996.
- KAWAUCHI, H. & SOWER, S. A. The dawn and evolution of hormone in the adenohipophysis. *General and Comparative Endocrinology*, 148: 3-14. 2006.
- KITANO, T., TAKAMUNE, K., NAGAHAMA, Y., ABE, S. I. Aromatase inhibitor and 17alpha-methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Reproduction and Development*, 56: 1-5, 2000.
- KLENKE, U. & ZOHAR, Y. Gonadal regulation of gonadotropin subunit expression and pituitary LH protein content in female hybrid striped bass. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28: 25–27, 2003.
- KOBAYASHI, Y., ALAM, M. A., HORIGUCHI, R., SHIMIZU, A., NAKAMURA, M. Sexually dimorphic expression of gonadotropin subunits in the pituitary of protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*): Evidence that follicle-stimulating hormone (FSH) induces gonadal sex change. *The Society for the Study of Reproduction*. DOI:10.1095/biolreprod.109.080986. 2010.
- LAIZ-CARRIÓN, R., SEGURA-NOGUERA, M. D. M., MARTÍN-DEL-RÍO, M. D. P., MANCERA, J. M. Ontogeny of the American shad (*Alosa sapidissima*). *General and Comparative Endocrinology*, 132: 454-464, 2003.

- LEVAVI-SIVAN, B.; BOGERD, J., MAÑANÓS, E. L., GÓMEZ, A., LAREYRE, J. J. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 412-437, 2010.
- LI, C. J., ZHOU, L., WANG, Y., HONG, Y. H., GUI, J. F. Molecular and expression characterization of three gonadotropin subunits common α , FSH β and LH β in groupers. *Molecular Cellular Endocrinology*, 233: 33-46, 2005.
- LONE, K. P., AL-ABLANI, S., AL-YAQOUT, A. Steroid hormone profiles and correlative gonadal histological changes during sex reversal of sobaity kept in tanks and sea cages. *Fish Physiology and Biochemistry*, 513-520, 1983.
- MARINO, G., AZZURRO, E., FINOIA, M. G., MESSINA, M. T., MASSARI, A., MANDICH, A. Recent advances in induced breeding of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Ciheam Options Mediterraneennes*, 47: 215-225, 2000.
- MATSUBARA, H., LOKMAN, P. M., SENAHA, A., KAZETO, Y., IJIRI, S., KAMBEGAWA, A., HIRAI, T., YOUNG, G., ADACHI, S., YAMAUCHI, K. Synthesis and possible function of 11-ketotestosterone during oogenesis in eel (*Anguilla* spp.). *Abstracts of 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Mie, Japan, 90, 2003.
- MAZZONI, T. S. Formação do epitélio germinativo durante a morfogênese e diferenciação gonadal em *Cyprinus carpio* (Teleostei: Cypriniformes): análise estrutural e ultraestrutural das células germinativas. Dissertação de Mestrado Universidade Estadual de Campinas. 2009.
- MOTEOS. J., MANANOS. E., MARTINEZ-RODRIGUES, G., CARRILLO, M., QUERAT, B., ZANUY, S. Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (α , FSH β , and LH β) and their expression during the reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 133: 216-232, 2003.
- MUNOZ, R. C., WANER, R. R. A. New version of the size-advantage hypothesis for sex change: Incorporating sperm competition and fecundity skew. *The American Naturalist*, 161: 749-61, 2003.

- NAGAHAMA, Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Development Biology*, 38: 217-229, 1994.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. Lehninger: Principles of Biochemistry. (Fourth Ed.) *Freeman and Company*, New York, 2000.
- NÓBREGA, R. H. Alterações do epitélio germinativo masculino, células endócrinas testiculares e células gonadotrópicas durante o ciclo reprodutivo de *Serrasalmus spilopleura* (Kner, 1859) e *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 2006.
- PERRY, A. N., GROBER, M. S. A model for social control of sex change: interactions of behavior, neuropeptides, glucocorticoids, and sex steroids. *Hormones and Behavior*, 43: 31-38, 2003.
- PLANAS, J. V., SWANSON, P., RAND-WEAVER, M., DICKHOLFF, W. W. Somatolactina stimulates in vitro gonadal steroidogenesis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and comparative Endocrinology*, 87: 1-5, 1992.
- POLICANSKY, D. Sex change in animals and plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 13: 471-495, 1982.
- PRICE, D. J. Genetic of sex determination in fishes – a brief review. In: *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*. I G. H. Potts and R. J. Wootton (eds.). London: Academic Press, 77-89, 1984.
- RAND-WEAVER, M., NOSO, T. MURAMOTO, K., KAWAUCHI, H. Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. *Biochemistry*, 30: 1509-1515, 1991.
- REINBOTH, R. & BRUSLE-SICARD, S. Histological and ultrastructural studies on the effects of hCG on sex inversion in the protogynous teleost *Coris julis*. *Journal of Fish Biology*, 51, 738–749, 1997.
- REINBOTH, R. Intersexuality in fishes. *Mem. Soc. Endocrinol.* 18: 515-543. 1970.

- REINBOTH, R. Modes of reproduction in fishes. In E. Knobil and J.D. Neill (eds.) *Encyclopedia of Reproduction*. London: Academic Press, 2: 365-372. 1998.
- REINBOTH, R. Physiological problems of teleost ambisexuality. *Environmental Biology of Fish*, 22: 249-259, 1988.
- REINBOTH, R. The peculiarities of gonad transformation in teleosts. *Differentiation*, 82-86, 1983.
- ROBERTSON, D. R. & JUSTINES, G. Protogynous hermaphroditism and gonochorism in four Caribbean reef gobies. *Environmental Biology of Fish*, 7: 137-142, 1982.
- ROCHA, M. J., ROCHA, E. Morphofunctional aspects of reproduction from Synchronous to Asynchronous fishes-an overview. In: Manfred Reinecke, Giacomo Zaccone e B.G. Kapoor (Eds.). *Fish Endocrinology*, 2: 571-623, 2006.
- RODRIGUES-FILHO, J. A., SANCHES, E. G., GARCIA, C. E. O., PANNUTI, C. V., SEBASTIANI, E. F., MOREIRA, R. G. Threatened fishes of the world: *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Serranidae: Epinephelinae). *Environmental Biology of Fish*, 85: 301-302, 2009.
- SADOVY, Y., SHAPIRO, D. Y. Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia*, 1: 136-156, 1987.
- SANCHES, E. G., OLIVEIRA, I. R., SERRALHEIRO, P. C. S. Inversão sexual da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. *Revista Brasileira de Saúde e Produtividade*, 10: 198-209, 2009.
- SÃO PAULO. Decreto Estadual no 53494-2008 de 02 de outubro de 2008. Diário Oficial do Estado de São Paulo 118(187). Secretaria do Meio Ambiente. 2008.
- SARTER, K., PAPADAKI, M, ZANUY, S. MYLONAS, C. Permanent sex inversion in 1-year -old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17 α -methyltestosterone implants. *Aquaculture*, 256: 443-456, 2006.

- SCHULZ, R. W., FRANÇA, L. R., LAREYRE, J.J. LEGAC, F., CHIARINI-GARCIA, H., NOBREGA, R. H. MIURA, T. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 390-411, 2010.
- SCHULZ, R. W., MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 43-56, 2002.
- SEGATELLI, T. L., BATLOUNI, S. R., FRANÇA, L. R. Duration of spermatogenesis in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Theriogenology*, 72: 894–901, 2009.
- SEGURA-NOGUERA, M. M., LAIZ-CARRIÓN, R. MARTÍN DEL RÍO, M. P., MANCERA, J. M. An immunocytochemical study of the pituitary gland of the white seabream (*Diplodus sargus*). *The Histochemical Journal*, 32: 733-742, 2000.
- SENAHA, A., MATSUBARA, H., TAKAHASHI, T., TODO, T., ADACHI, S., YAMAUCHI, K. The role of androgens in early oogenesis in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Zoological Science*, 20: 1603, 2003.
- SHAPIRO, D. Y. Differentiation and evolution of sex change in fishes. *Biology Science*, 37: 490-497, 1987.
- SHIMIZU, A. TANAKA, H. KAGAWA, H. Universal antisera for immunocytochemical of two different gonadotrophs in acanthopterygians fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 29: 275-287, 2003.
- SLATER, C. H., SCHRECK, C. B., SWANSON, P. Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Comparative Biochemistry Physiology*, 109: 167–175, 1994.
- SMITH, C. L. The patterns of sexuality and classification of serranid fishes. *Am. Mus. Novit.* 2207: 1-20, 1965.
- SMITH, C.L. A revision of the American groupers: *Epinephelus* and allied genera. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 146: 1-241, 1971.
- SOHN, Y.C., KOBAYASHI, M., AIDA, K. Regulation of gonadotropin β subunit expression by testosterone and gonadotropin-releasing hormones in the

- goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 129: 419-426, 2001.
- SPEDICATO, M.T., LEMBO, G., DI MARCO, P., MARINO, G. Preliminary results in the breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cah. Options Méditerran*, 16: 131-148, 1995.
- SWANSON, P., SUZUKI, K., KAWAUCHI, H., DICKHOFF, W. W. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biology Reproduction*, 44: 29-38, 1991.
- SWAPNA, I. & SENTHILKUMARAN, B. Influence of ethynylestradiol and methyltestosterone on the hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis of adult air-breathing catfish *Clarias gariepinus*. *Aquatic Toxicology*, 95: 222-229, 2009.
- TACHIBANA, L., CASTAGNOLLI N., PEZZATO, E. L., BARROS, M. M., VALLE, J. B., SIQUEIRA, M. R. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, Maringá, 26: 305-311, 2004.
- VAZZOLER, A. E. A. M. *Biologia da Reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá, EDUEM. 14-16, 1996.
- VISSIO, P. G., SOMOZA, G. M., MAGGESE, M. C., PAZ, D. A., STRUSSMANN. Structure and cell type distribution in the pituitary gland of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Fisheries Sciences*, 63: 64-68, 1997.
- WARNER, R. R. Mating systems, sex change and sexual demography in the rainbow wrasse, *Thalassoma lucasanum*. *Copeia*, 653-670, 1982.
- WELTZIEN, F. A., ANDERSSON, E., ANDERSEN, O., SHALCHIAN-TABRIZI, K., NOBERG, B. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137: 447-277, 2004.
- XIONG, F., LIU, D., LE DR'ÉAN, Y., ELSHOLTZ, H. P., HEW, C. L., Differential recruitment of steroid hormone response elements may dictate the expression of the pituitary gonadotropin II_ subunit gene during salmon maturation. *Molecular Endocrinology*, 8: 782-793, 1994.

- YEH, S. L., DAI, Q. C., CHU, Y. T., KUO, C. M., TING, Y. Y., CHANG, C. F. Induced sex change, spawning and larviculture of potato grouper, *Epinephelus tukula*. *Aquaculture*, 228: 371- 381, 2003.
- YOUNG, G. KUSAKABE, M. NAKAMURA, I. Gonadal Steroidogenesis in Teleost Fish. In: Hormones and their Receptors in Fish Reproduction, MELAMED & SHERWOOD, World Scientific, v.4, 155, 2005.
- ZHANG, W., ZHANG, Y., ZHANG, L., ZHAO, H., LI, X., HUANG, H., LIN, H., The mRNA expression of P450 aromatase, gonadotropin β -subunits and FTZ-F1 in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) during 17 α -methyltestosterone-induced precocious sex change. *Molecular Reproduction and Development*, 74: 665-673, 2007.
- ZOHAR, Y., MUÑOZ-CUETO, J .A., ELIZUR, A., KAH, O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 438-455, 2010.

8 – Tabelas

Tabela 1: Grupos experimentais de *Epinephelus marginatus* e seus respectivos tratamentos.

| Tratamentos | n° de animais | Massa corpórea (gramas) | | | Doses (mg/Kg) |
|-------------|---------------|-------------------------|------------|------|---------------|
| | | < 250 | 250. - 500 | >500 | |
| OP | 12 | 4 | 4 | 4 | --- |
| AI | 13 | 4 | 5 | 4 | 100 |
| MT | 13 | 4 | 5 | 4 | 15 |
| MT+AI | 13 | 4 | 5 | 4 | 7,5 +100 |

Tabela 2: Desenho experimental das doses aplicadas a *E. marginatus* e o tempo de sacrifício dos animais.

| Dias experimentais | Doses aplicadas | Animais Sacrificados |
|--------------------|-----------------|----------------------|
| 0 | 1 | 6 |
| 30 | 1 | 8 (2/tratamento) |
| 60 | 1 | 8 (2/tratamento) |
| 90 | ---- | 20 (5/tratamento) |

* Dezembro 2008/março 2009.

Tabela 3: Anticorpos primários de gonadotropinas utilizados nos estudos de imunohistoquímica de *Epinephelus marginatus*.

| Anticorpos | Fonte | Código | Diluição |
|-----------------------------|--------------|--------|----------|
| Chum salmon β -FSH* | Dr. Kawauchi | 8510 | 1:1000 |
| Chum salmon β -LH* | Dr. Kawauchi | 8506 | 1:1000 |
| Chum salmon Somatolactin | Dr. Kawauchi | 8906 | 1:1000 |

* Nota: Os anticorpos são monoclonais e foram produzidos em coelhos.

Tabela 4: *Epinephelus marginatus* – Porcentagem de células marcadas com anti β -FSH e anti β -LH por grupo de tratamentos após 90 dias experimentais.

| Anticorpos | Tratamentos | Nº de animais | % de células marcadas (média \pm erro padrão) |
|--------------|-----------------------------|---------------|---|
| β -FSH | Inicial | 4 | 20,56 \pm 3,42 |
| | Operado Testemunho | 4 | 24,30 \pm 1,12 |
| | Inibidor de Aromatase | 5 | 15,92 \pm 3,29 |
| | Metiltestosterona | 5 | 17,18 \pm 2,60 |
| | Metiltest. + Inb. Aromatase | 4 | 23,89 \pm 3,04 |
| β -LH | Inicial | 4 | 23,89 \pm 1,45 |
| | Operado Testemunho | 5 | 35,35 \pm 2,04 |
| | Inibidor de Aromatase | 5 | 26,42 \pm 7,57 |
| | Metiltestosterona | 5 | 28,09 \pm 7,38 |
| | Metiltest. + Inb. Aromatase | 4 | 32,65 \pm 1,05 |

Tabela 5: *Epinephelus marginatus* – Porcentagem de células marcadas com anti β -FSH e anti β -LH em fêmeas, intersexo e machos após 90 dias experimentais.

| Anticorpos | Tratamentos | Nº de animais | % de células marcadas (média \pm erro padrão) |
|--------------|-------------|---------------|---|
| β -FSH | Fêmeas | 10 | 21,16 \pm 0,55 |
| | Intersexo | 5 | 16,92 \pm 1,41 |
| | Machos | 6 | 19,97 \pm 1,33 |
| β -LH | Fêmeas | 10 | 28,03 \pm 0,55 |
| | Intersexo | 5 | 27,41 \pm 2,77 |
| | Machos | 6 | 31,86 \pm 2,23 |

9 - Figuras



Figura 1: Localização e procedimento experimental. **A)** Instituto de Pesca, Baía do Itaguá, Ubatuba-SP. **B)** Tanques-rede utilizados nos experimentos de inversão de sexo de *E. marginatus*. **C)** Exemplar de *Epinephelus marginatus* no momento da anestesia. **D)** Biometria de *Epinephelus marginatus* no momento das coletas.

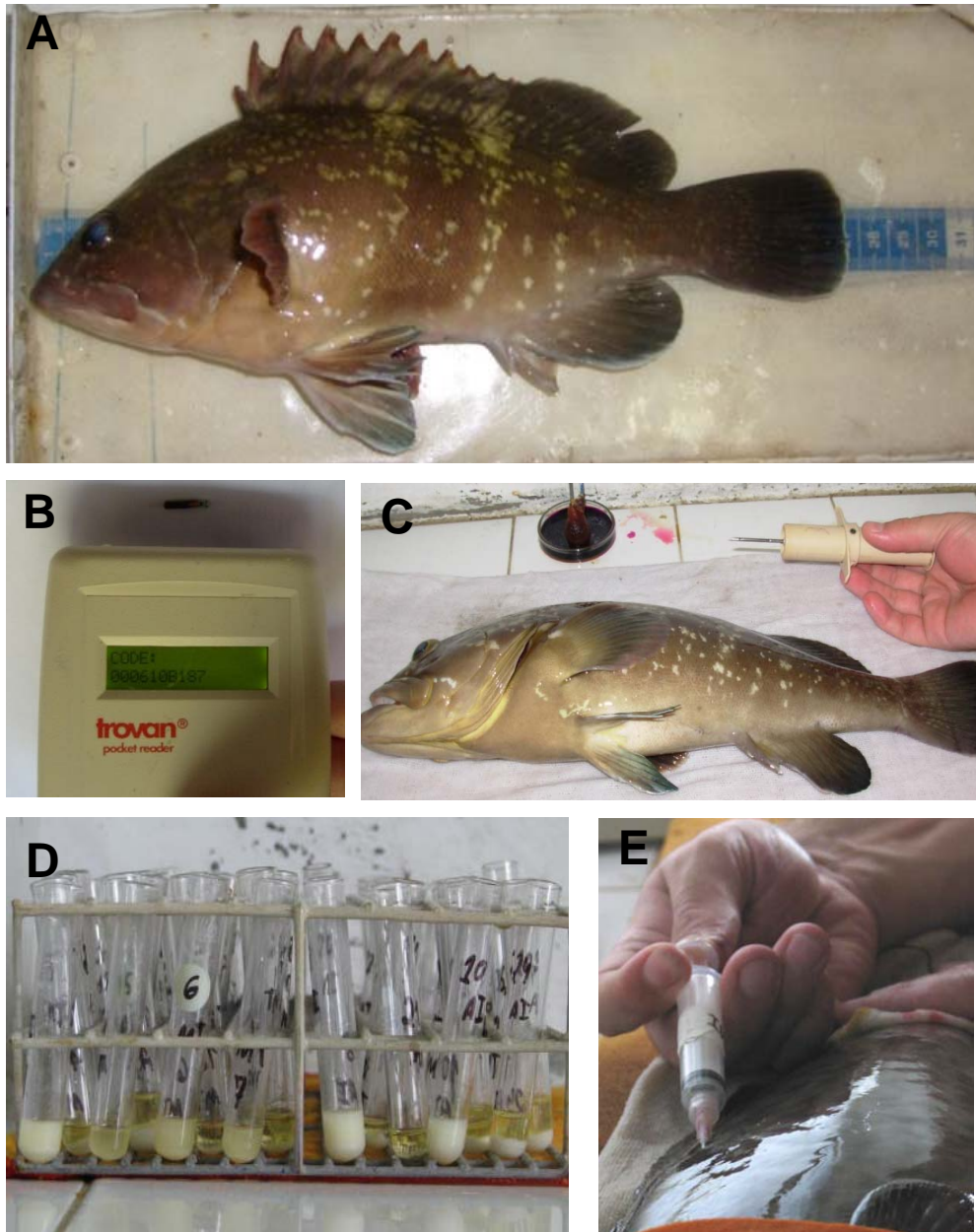


Figura 2: *E. marginatus* - Procedimento experimental. **A)** Biometria de *Epinephelus marginatus* no momento das coletas. **B-C)** Chips eletrônicos, leitoras e aplicação dos chips na musculatura dorsal. **D)** Doses de AI e MT preparadas para serem individualmente aplicadas em exemplares de *Epinephelus marginatus*, de acordo com a massa corpórea. **E)** Aplicação do tratamento na musculatura dorsal.

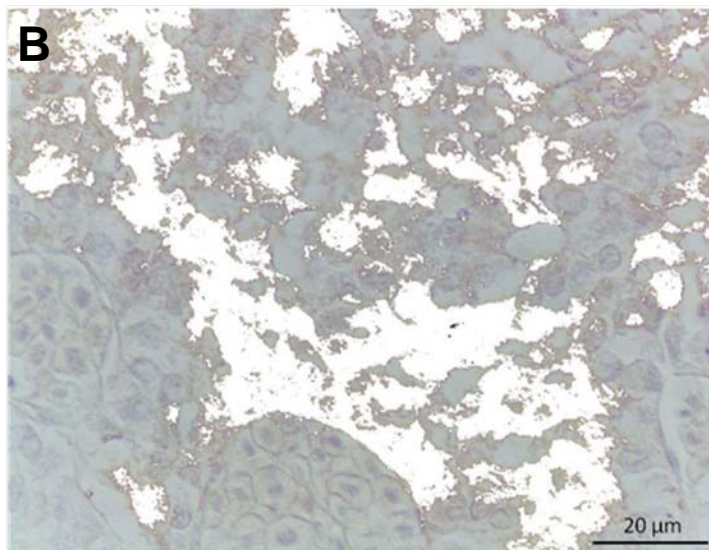
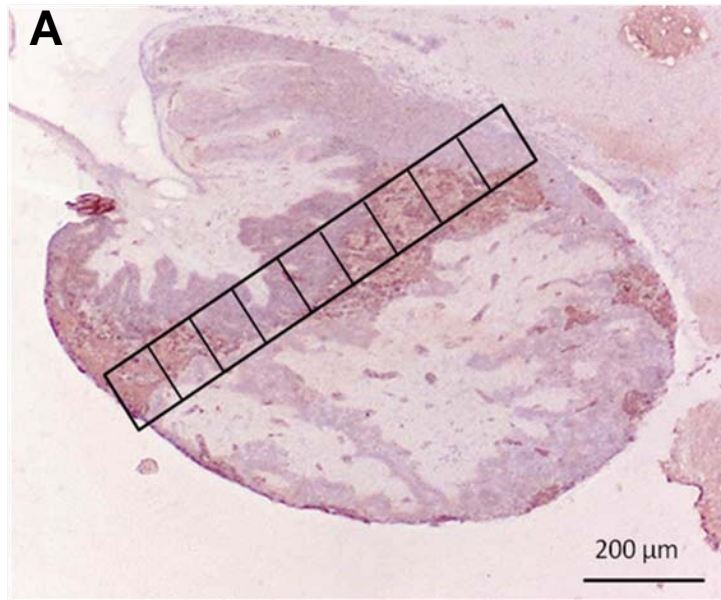


Figura 3: *E. marginatus*. **A)** Sequências de imagens capturadas na hipófise de *Epinephelus marginatus* após a análise imunohistoquímica. **B)** Imagem da hipófise de *Epinephelus marginatus* após a análise no programa MATLAB.

Figura 4: *Epinephelus marginatus* - **A)** Índice gonadossomático (IGS) de *Epinephelus marginatus* expostos aos diferentes tratamentos, após 90 dias experimentais. ^{a,b}Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro dos grupos experimentais. **B)** Gônadas do grupo operado testemunho após 90 dias experimentais (massa gonadal: 0,3 g). **C)** Gônadas do grupo inibidor de aromatase após 90 dias experimentais (massa gonadal: 0,42 g). **D)** Gônadas do grupo metiltestosterona após 90 dias experimentais (massa gonadal: 0,05 g).

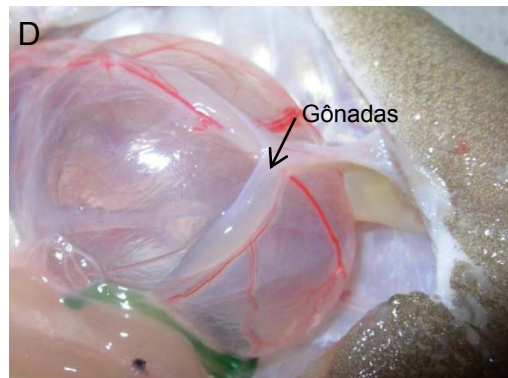
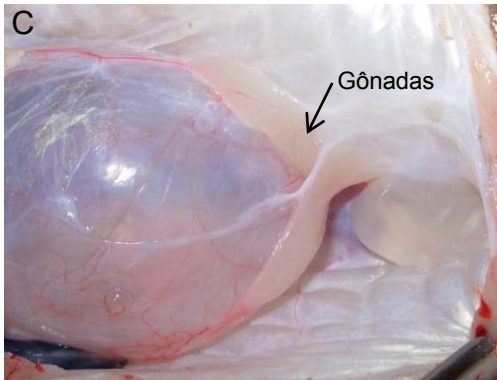
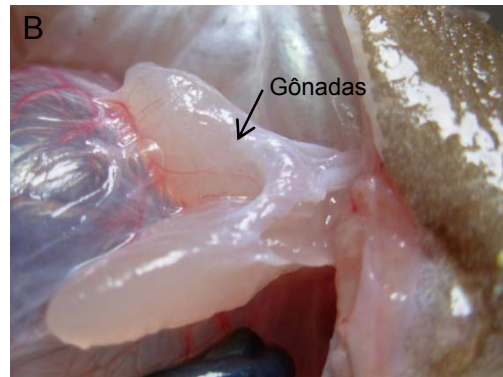
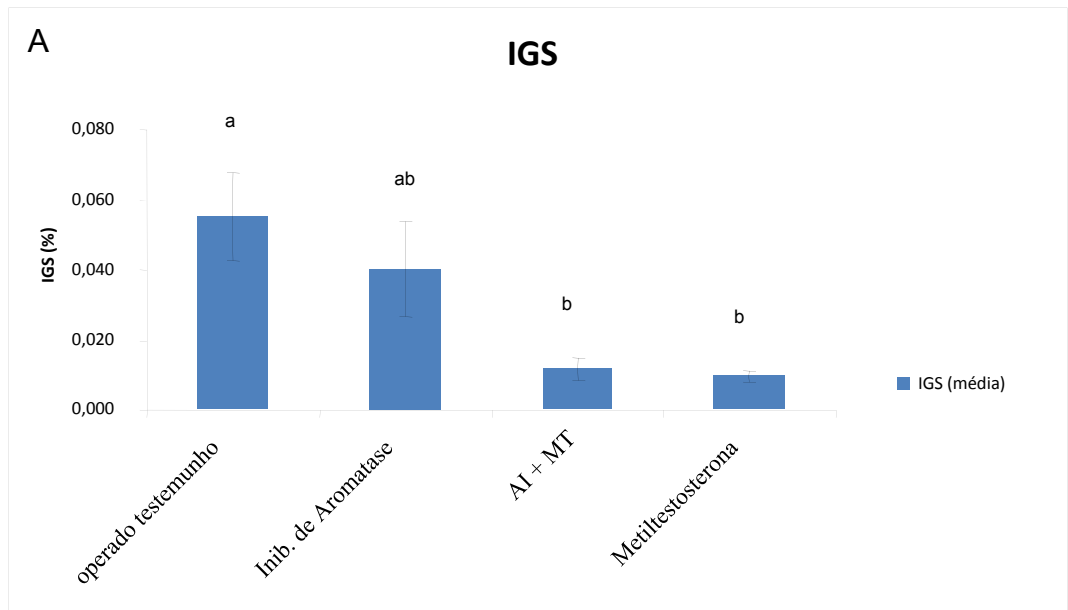


Figura 5: *Epinephelus marginatus* – Secções histológicas apresentando as estruturas dos ovários antes do procedimento experimental (grupo inicial). **A)** Organização do ovário. **B)** Maior aumento evidenciando a arquitetura do ovário. **C)** Epitélio germinativo do ovário. Notar a membrana basal que suporta o epitélio germinativo separando-o do estroma. **D)** Tipos celulares do epitélio germinativo. Observar as células pré-foliculares individualizando e envolvendo o oócito. **E)** Oogônias, cromatina nuclear diplóteno e crescimento primário. **F)** Oogônias, cromatina nucleolar diplóteno e oócito em crescimento primário com único nucléolo. **A – F:** cavidade luminal (*CLu*); compartimento germinativo (*CGe*); cápsula gonadal (*CG*); lamelas (*L*); estroma (*Es*); gônia (*G*); membrana basal (*Mb*); crescimento primário (*CP*); crescimento primário com único nucléolo (*CPun*); crescimento primário com múltiplos nucléolos (*CPmn*); cromatina nucleolar diplóteno (*CNd*); citoplasma (*C*), núcleo (*N*); nucléolos (*n*); oogônias (*Og*); células pré-foliculares (*Pf*). **A – F:** Coloração PAS + Metanil Yellow

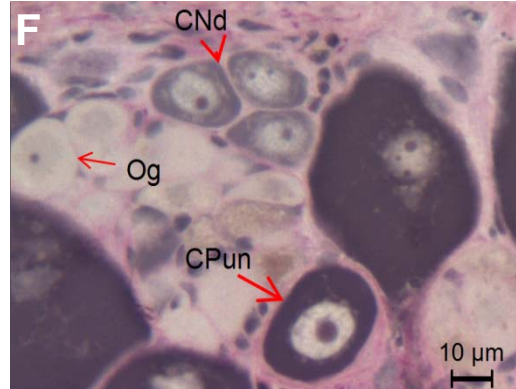
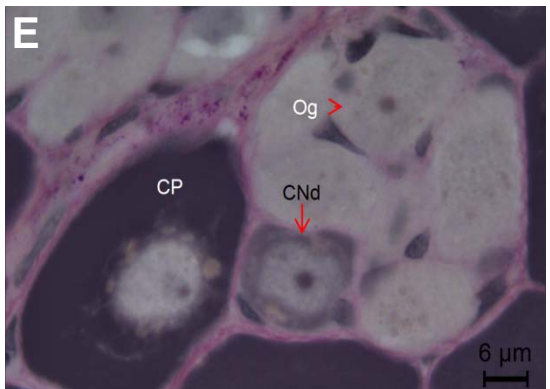
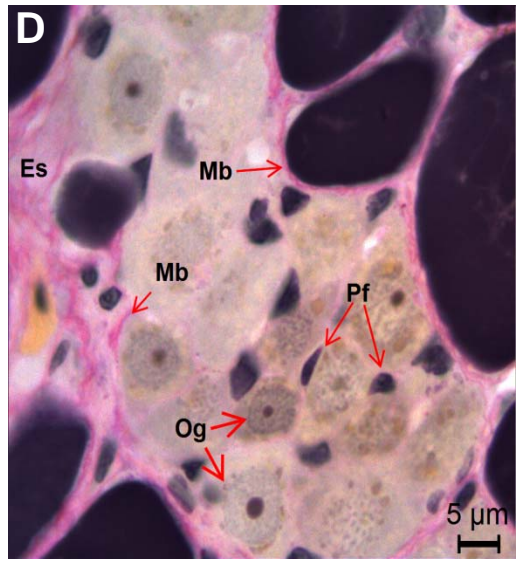
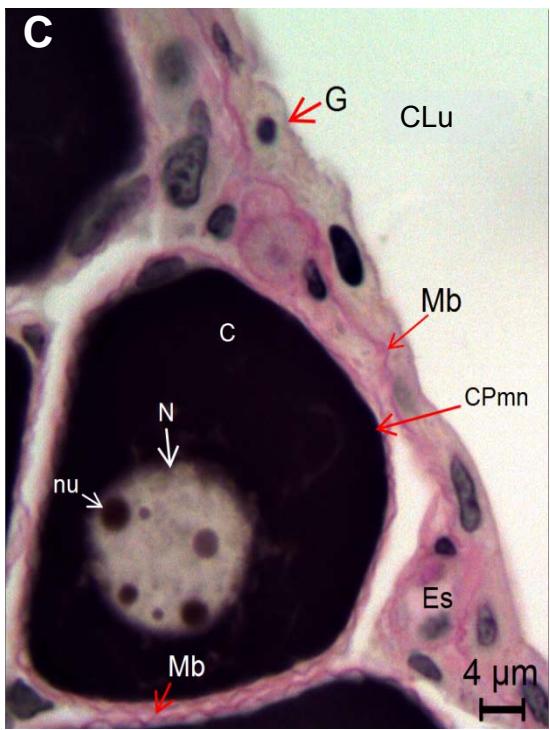
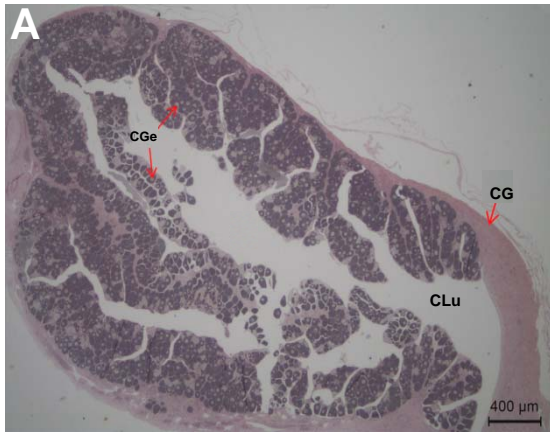


Figura 6: *Epinephelus marginatus* – Secções histológicas apresentando as estruturas dos ovários antes do procedimento experimental (grupo inicial). **A)** Ninhos de oogônias e oócitos em crescimento primário. **B)** Oócitos em cromatina nucleolar leptotênicos e crescimento primário. **C)** Aglomerados de supostas células produtoras de esteróides encontradas na cápsula gonadal. Notar os aglomerados próximos aos vasos sanguíneos. **D)** Supostas células produtoras de esteróides em maior aumento. **E)** Supostas células produtoras de esteróides. Notar os grânulos acidófilos no citoplasma. **A – E:** cavidade luminal (*CLu*); cápsula gonadal (*CG*); crescimento primário (*CP*); crescimento primário perinucleolar (*CPpn*); crescimento primário com múltiplos nucléolos (*CPmn*); ninhos de oogônias (*NO*); cromatina nucleolar leptotênico (*CNI*); células produtoras de esteróides (*CPE*); vaso sanguíneo (*VS*); hemácias (*H*). **A – E:** Coloração PAS + Metanil Yellow.

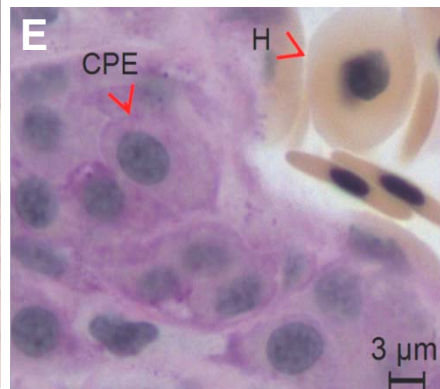
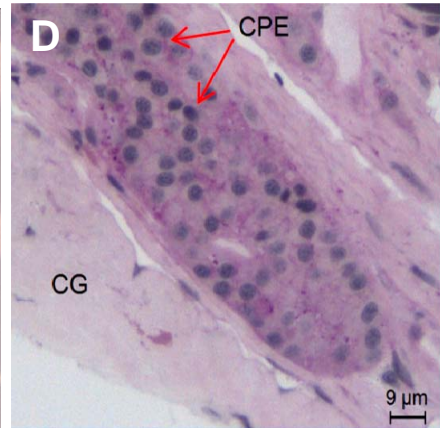
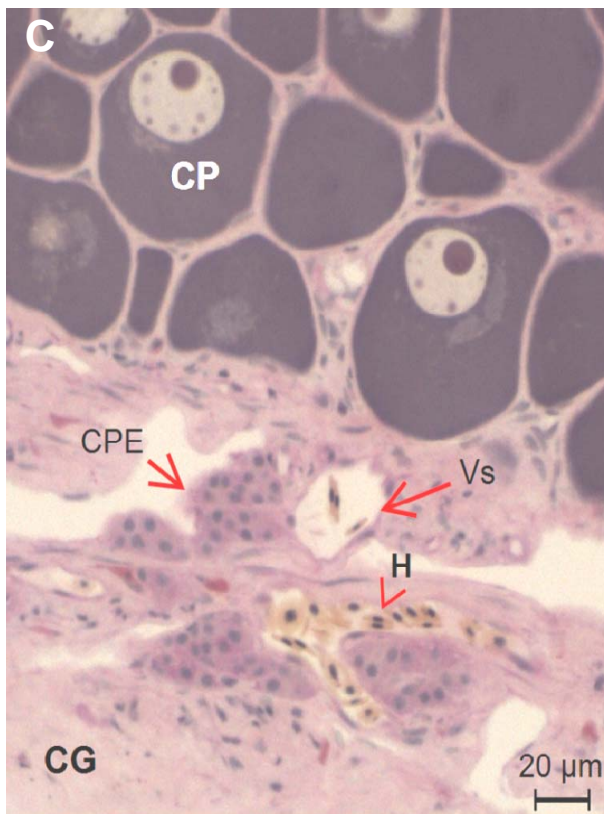
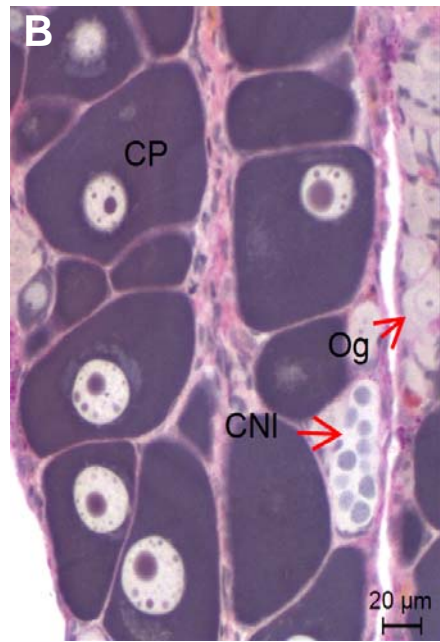
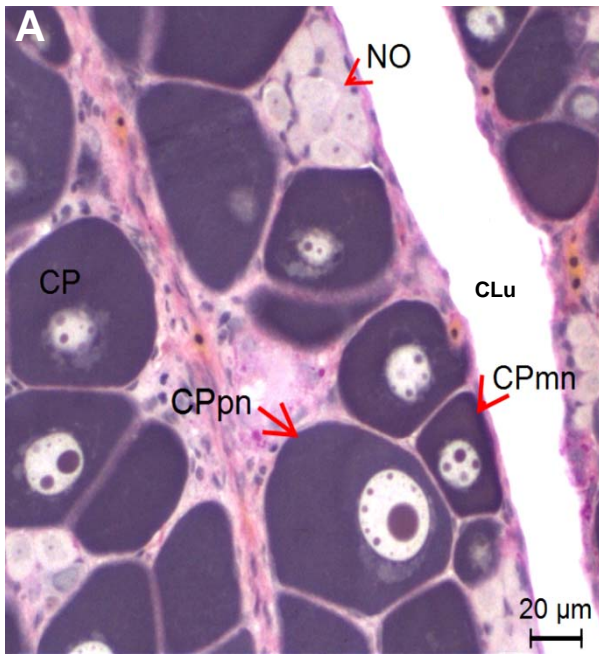


Figura 7: *Epinephelus marginatus* – Secções histológicas apresentando a estrutura gonadal em transição do sexo. Animais tratados com inibidor de aromatase (AI) e metiltestosterona (MT). **A)** Desorganização da arquitetura gonadal (grupo AI). **B)** Degeneração das células germinativas femininas e a proliferação do tecido intersticial (grupo AI). **C)** Desorganização gonadal em processo de inversão mais avançado (grupo MT). **D)** Proliferação das células germinativas masculinas e oócitos em degeneração (grupo MT). Notar a presença de centros melanomacrofágicos, estruturas responsáveis na remoção e reabsorção do tecido gonadal do sexo anterior. **E)** Gônada em processo de inversão mais avançados (grupo AI). **F)** Células germinativas masculinas em desenvolvimento (grupo MT). **A – F:** cavidade luminal (*CLu*); cápsula gonadal (*CG*); gônia (*G*); desorganização da arquitetura gonadal (*DAG*); oócitos degenerativos (*OD*); proliferação do tecido intersticial (*PTI*); centros melanomacrofágicos (*CMF*); espermatogônias (*Sg*); espermatocisto (*STC*); tecido intersticial (*TI*); espermatócito (*Sc*). Seta branca: células de Sertoli. **A – F:** Coloração PAS + Metanil Yellow.

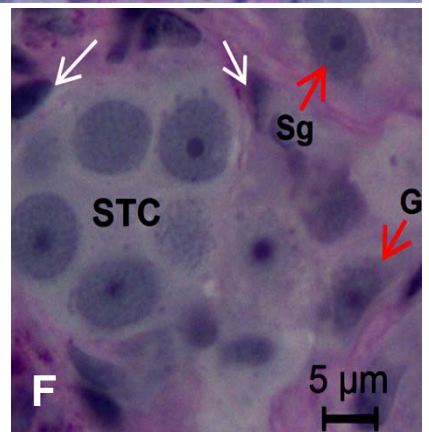
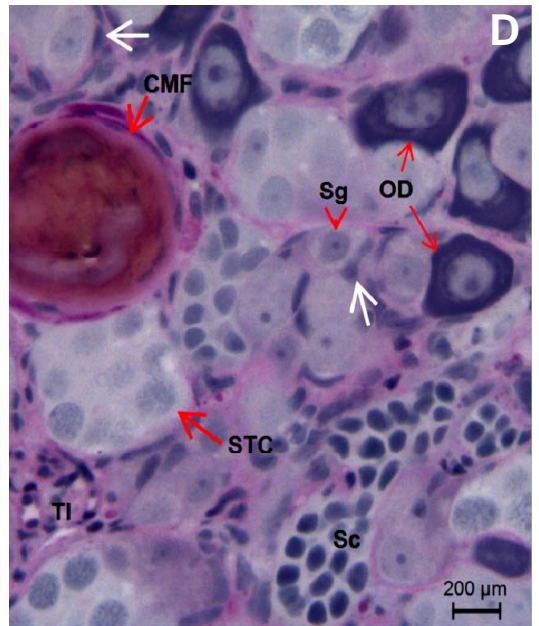
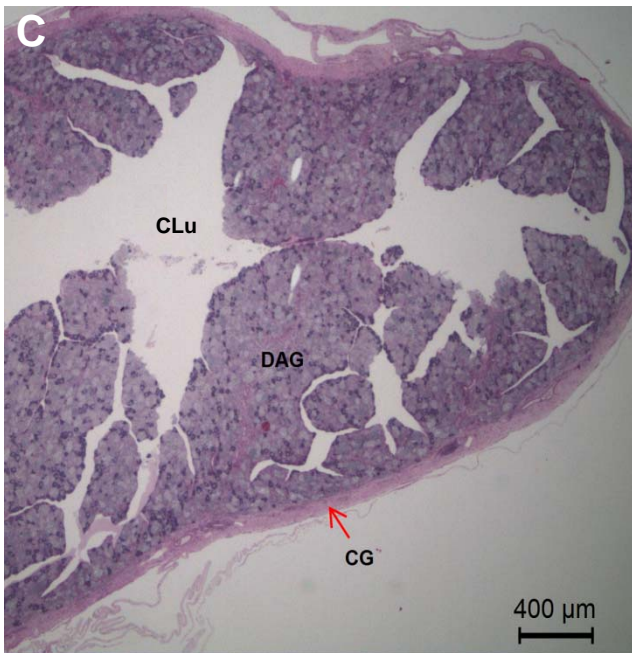
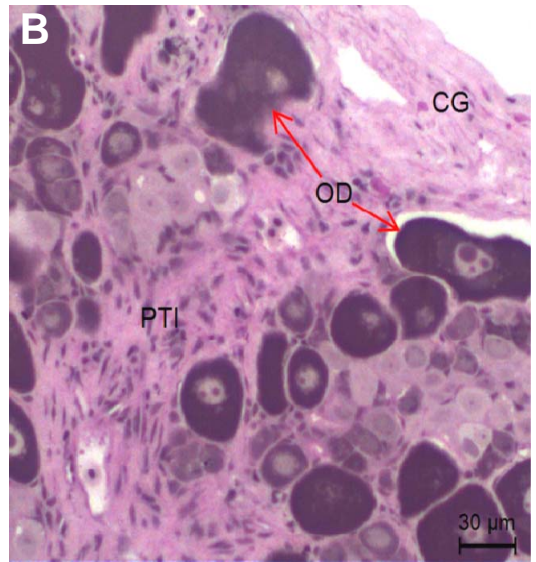
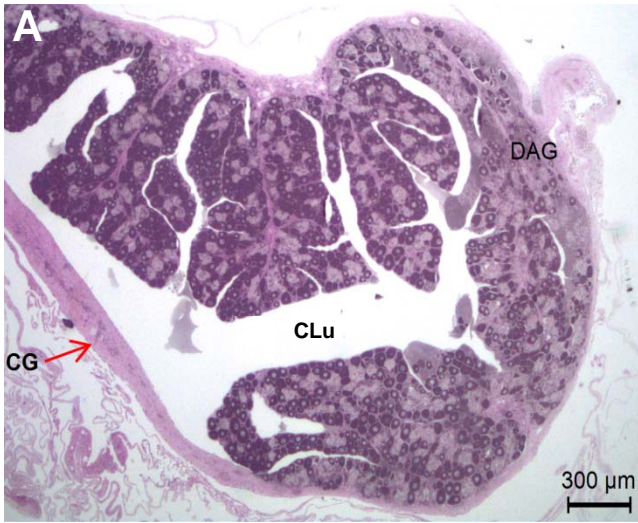


Figura 8: *Epinephelus marginatus* – Secções histológicas apresentando as estruturas das gônadas revertida. Animais tratados com metiltestosterona (MT). **A)** Arquitetura e organização das gônadas invertidas. **B)** Diversos tipos de células germinativas masculinas. Notar a presença dos aglomerados de supostas células produtoras de esteróides, agora denominadas células de Leydig. **A – B:** células de Leydig (CL); cápsula gonadal (CG); tecido intersticial (TI); centros melanomacrofágicos (CMF); espermatogônias primárias (Sg I); espermatogônias secundárias (Sg II); espermatócito (Sc); cavidade luminal (CLu); vaso sanguíneo (VS). **A – B:** Coloração PAS + Metanil Yellow.

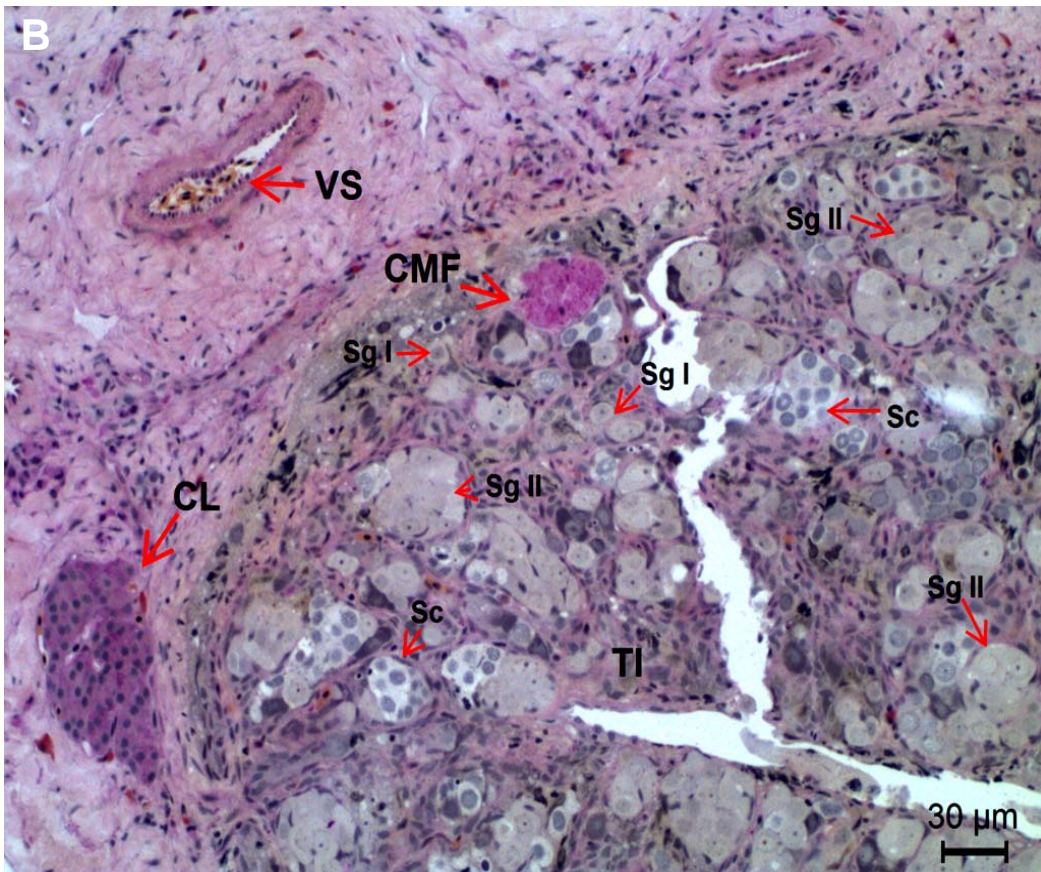
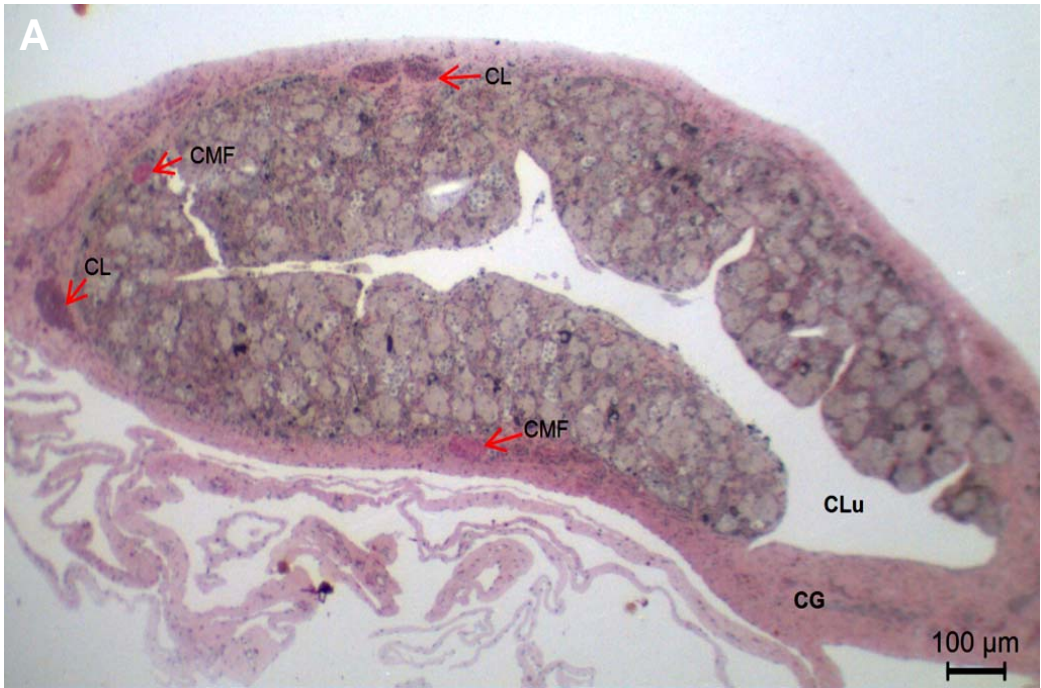


Figura 9: *Epinephelus marginatus* – Secções histológicas apresentando o desenvolvimento das células masculinas. **A)** Células de Leydig, células somáticas e células germinativas. **B)** Detalhe das células de Leydig evidenciando o núcleo pequeno e esférico com cromatina compacta, e o citoplasma de aspecto homogêneo com pontos acidófilos. **C)** Início do desenvolvimento das células germinativas masculinas. Notar as células de Sertoli entre as espermatogônias e envolvendo-as individualmente por prolongamentos citoplasmáticos formando um espermatocisto. **D)** Diferentes tipos das células germinativas dentro dos espermatocistos. Notar os espermatócitos e as espermatídes iniciais. **F)** Diferentes tipos celulares durante a espermatogênese. Notar que as espermatídes finais são células ainda menores e completamente esféricas, com citoplasma escasso, e o núcleo com cromatina ainda mais compacta. **E e G)** Espermatozóides e células de Leydig. **A – G:** células de Leydig (CL); cápsula gonadal (CG); tecido intersticial (TI); células somáticas (CS); espermatogônias (Sg); espermatócito (SC); gônias (G); hemácias (H); espermatídes iniciais (STi); espermatídes finais (STf); espermatozóides (SZ). Cabeça de setas e setas brancas: células de Sertoli. **A – G:** Coloração PAS + Metanil Yellow.

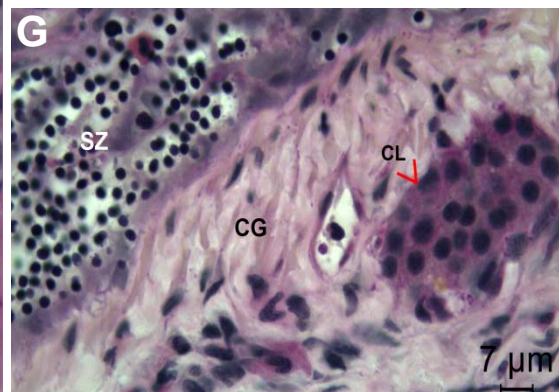
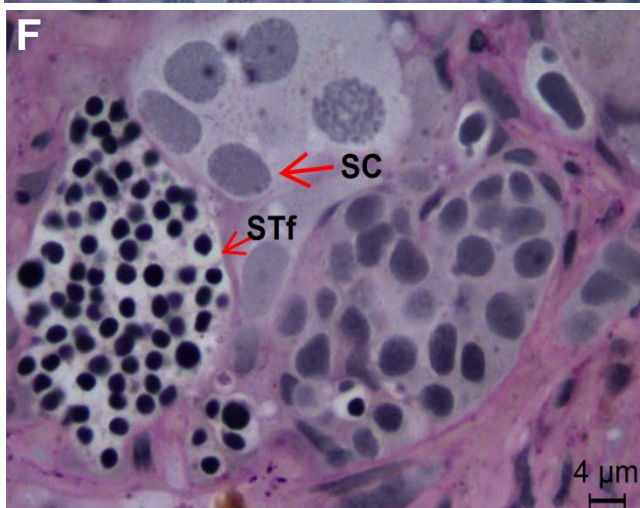
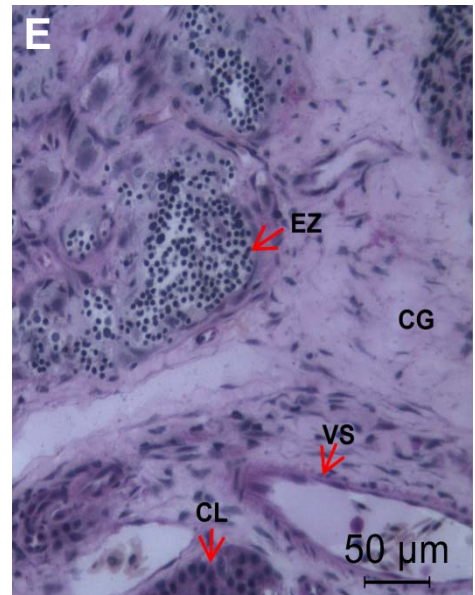
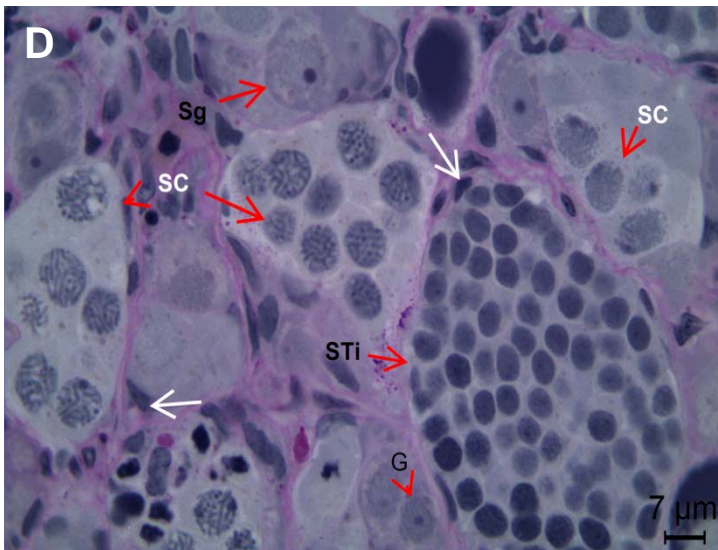
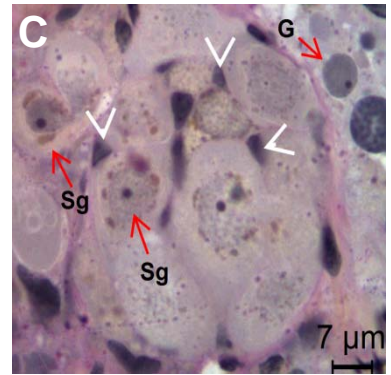
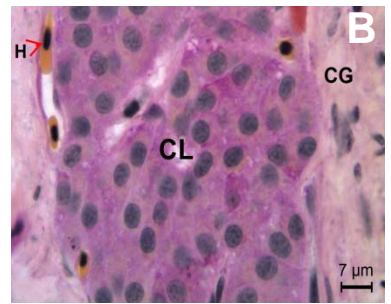
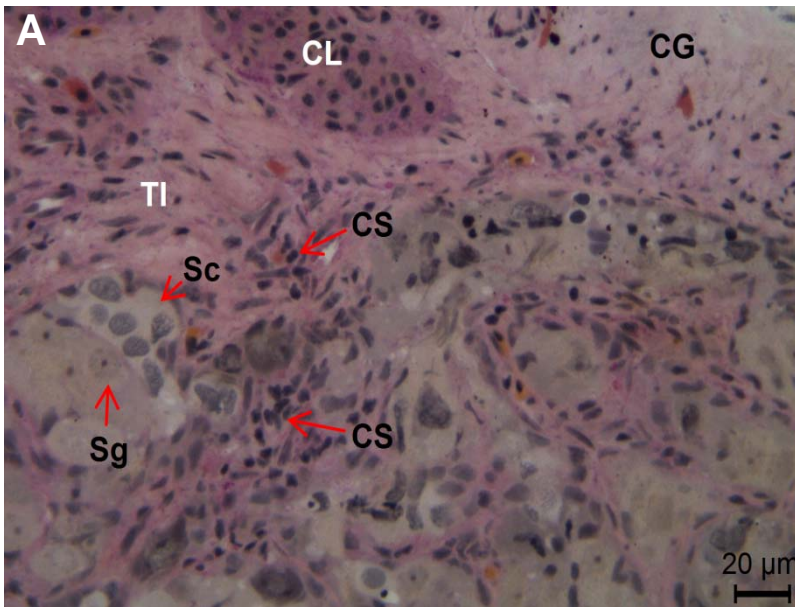


Figura 10: *Epinephelus marginatus* – Secções histológicas apresentando as estruturas dos ovários dos animais do grupo operado testemunho. Todos os animais mantiveram o mesmo padrão gonadal dos animais iniciais após os 30, 60 e 90 dias experimentais. **A)** Organização do ovário. **B)** Maior aumento evidenciando as supostas células produtoras de esteróides imersas na cápsula gonadal do ovário. **C)** Epitélio germinativo do ovário. Notar as diferentes fases das células germinativas femininas e um cisto contendo oócitos leptotênicos. **D)** Compartimento germinativo do ovário. Notar a presença de tecido intersticial, oogônias, oócitos em cromatina nucleolar leptotênicos e oócitos em crescimento primário no compartimento germinativo do ovário. **E)** Oócitos em cromatina nucleolar leptotênicos e crescimento primário. Notar o aumento do citoplasma. **F)** Gônias e oogônias. **A – F:** cavidade luminal (*CLu*); cápsula gonadal (*CG*); compartimento germinativo (*CGe*); células produtoras de esteróides (*CPE*); gônia (*G*); oócito em crescimento primário (*CP*); oócito em crescimento primário com múltiplos nucléolos (*CPmn*); citoplasma (*C*), núcleo (*N*); nucléolos (*nu*); tecido intersticial (*TI*); cromatina nucleolar leptotênicos (*CNI*). **A – F:** Coloração PAS + Metanil Yellow.

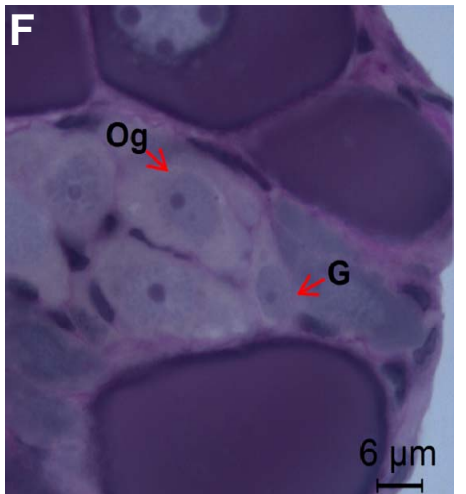
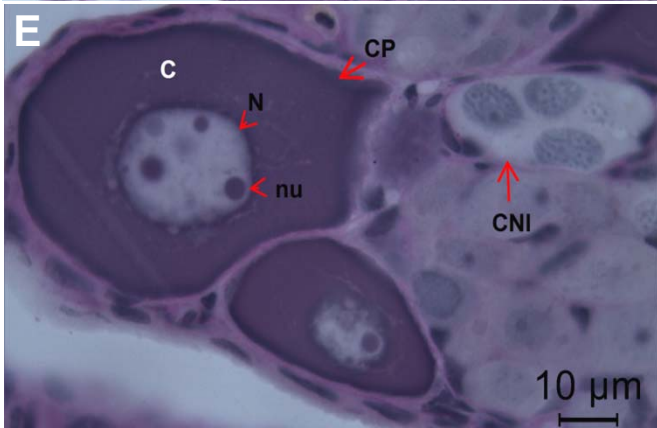
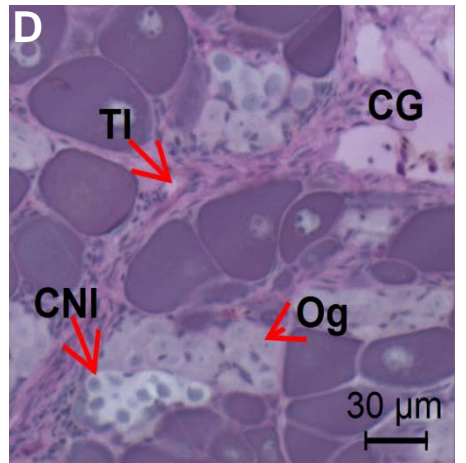
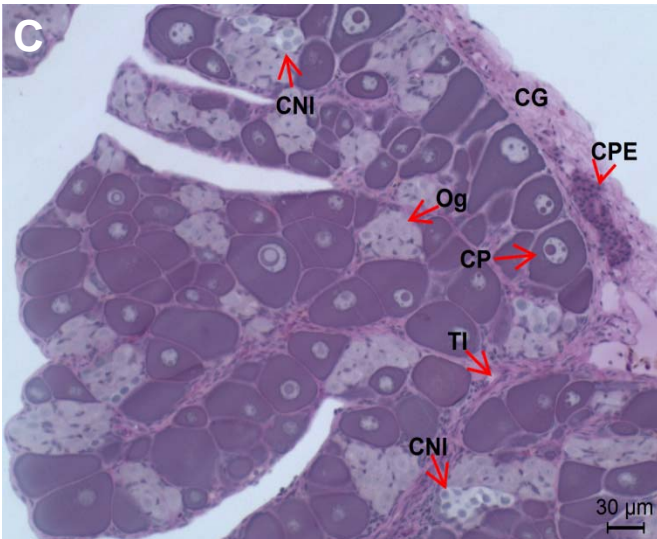
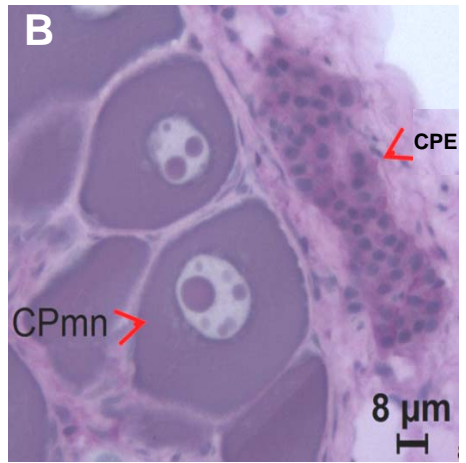


Figura 11: *Epinephelus marginatus* – Secções histológicas apresentando as estruturas gonadal em transição do sexo após 30 dias de tratamento com inibidor de aromatase (AI) e metiltestosterona (MT). **A)** Desorganização da arquitetura gonadal com o tratamento de inibidor de aromatase. **B)** Degeneração das células germinativas femininas e a proliferação do tecido intersticial (grupo AI). **C)** Desorganização gonadal em processos inicial de inversão mais avançado com tratamento de metiltestosterona. **D)** Oócitos degenerativos (grupo MT). Notar a desorganização dos oócitos e a dissociação das estruturas. **A – D:** cavidade luminal (*CLu*); cápsula gonadal (*CG*); desorganização da arquitetura gonadal (*DAG*); oócitos degenerativos (*OD*); tecido intersticial (*TI*); hemácias (*H*); desestruturação das lamelas (*DL*). **A, B, D:** Coloração PAS + Metanil Yellow. **B:** Hematoxilina e Eosina.

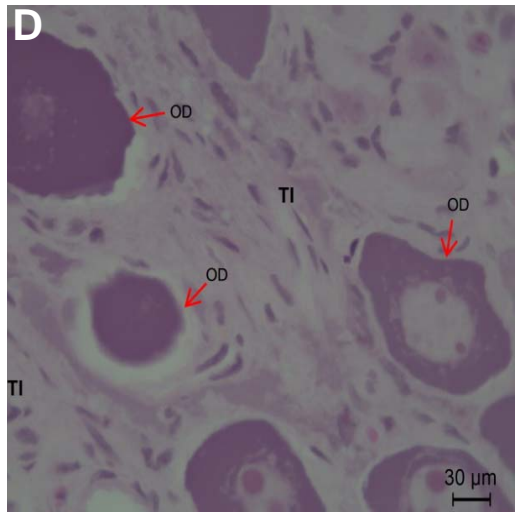
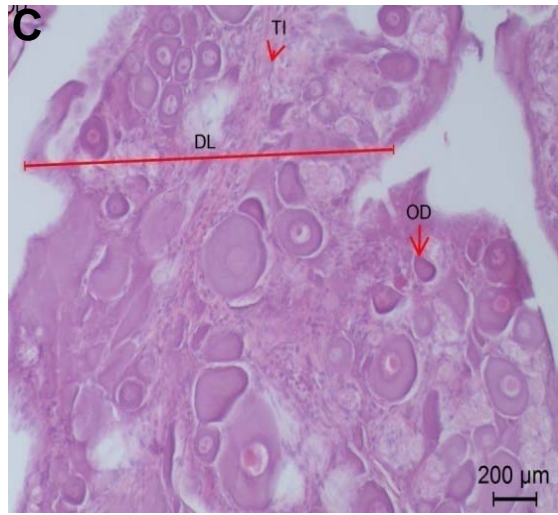
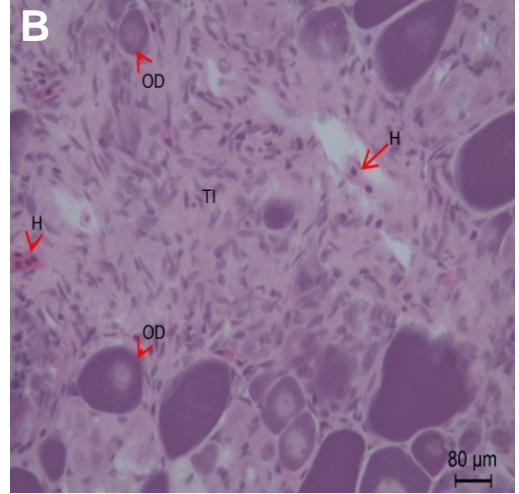
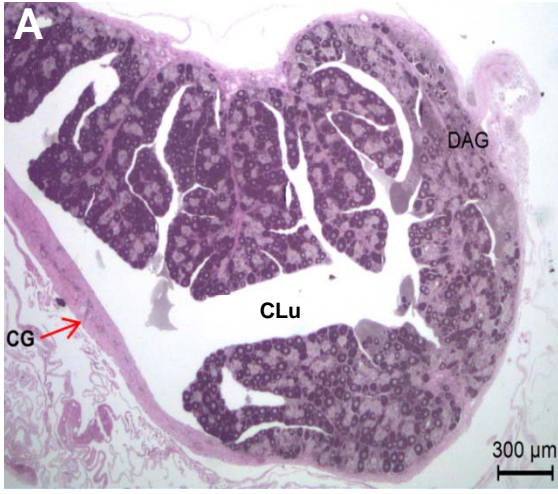


Figura 12: *Epinephelus marginatus* – Secções histológicas apresentando a estrutura gonadal em transição do sexo após 60 dias de tratamento com inibidor de aromatase (AI) e metiltestosterona (MT). **A)** Desorganização da arquitetura gonadal com inibidor de aromatase. **B)** Proliferação do tecido intersticial nos animais tratados com inibidor de aromatase. **C)** Oócito degenerativo (grupo AI). Notar a desorganização dos oócitos e a dissociação das estruturas. **D)** Desorganização da arquitetura gonadal mais avançada com o tratamento de metiltestosterona. **E)** Formação dos ductos espermáticos e espermatozóides dos animais tratados com metiltestosterona. **A – E:** cavidade luminal (*CLu*); cápsula gonadal (*CG*); oócitos degenerativos (*OD*); tecido intersticial (*TI*); espermatogônias (*Sg*); espermatozóides (*SZ*); ducto espermáticos (*DE*); compartimento germinativo em transição (*CGt*). **A-E:** Hematoxilina e eosina.

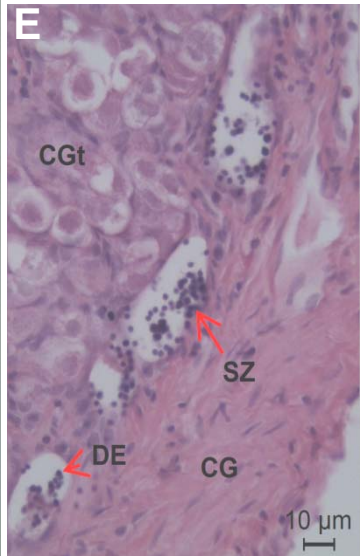
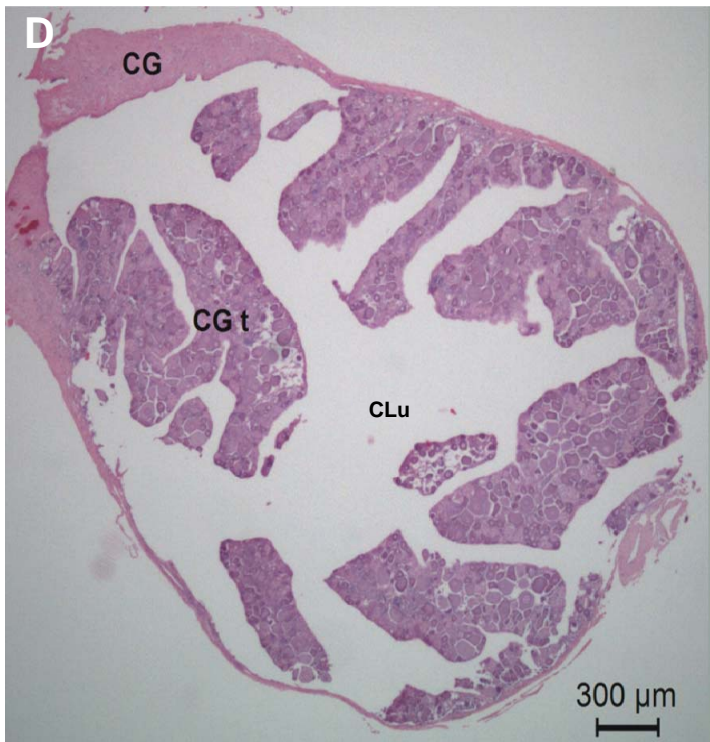
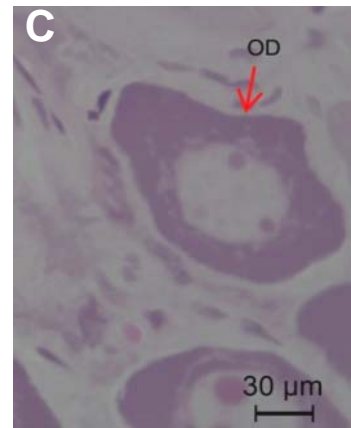
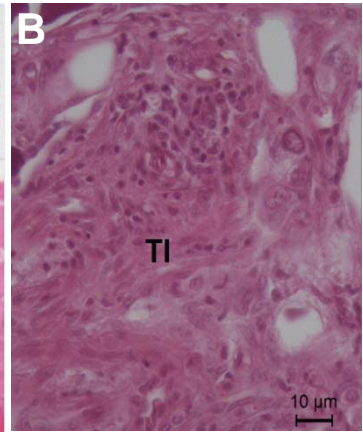
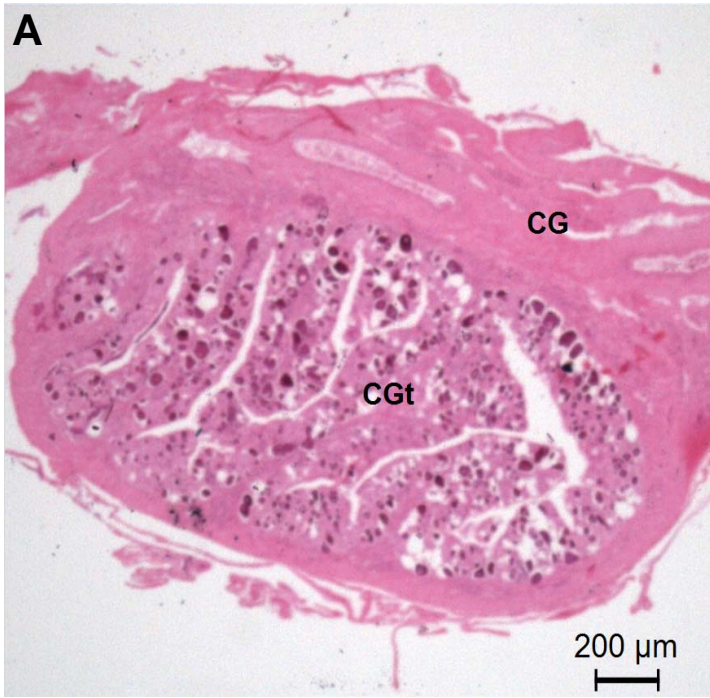


Figura 13: *Epinephelus marginatus* – Secções histológicas apresentando a estrutura gonadal em transição do sexo após 90 dias de tratamento com inibidor de aromatase e metiltestosterona. **A)** Desorganização da arquitetura gonadal com inibidor de aromatase. **B)** Proliferação do tecido intersticial e desenvolvimento das células germinativas masculinas nos animais tratados com inibidor de aromatase. **C)** Arquitetura da gônada tratada com metiltestosterona. **D)** Centros melanomacrofágicos no compartimento germinativo dos animais tratados com metiltestosterona. **E)** Cistos de células germinativas mais avançadas na espermatogênese dos animais tratados com metiltestosterona. Notar a presença de espermatozoides próximos as células de Leydig. **F)** Diferentes tipos de células germinativas masculinas (grupo MT). **A – F:** cavidade luminal (*CLu*); cápsula gonadal (*CG*); desestruturação da arquitetura gonadal (*DAG*); oócitos degenerativos (*OD*); espermatogônias (*Sg*); espermatócitos (*Sc*); espermátides iniciais (*STi*); células de Leydig (*CL*); centros melanomacrofágicos (*CMF*); **A-F:**Coloração PAS + Metanil Yellow.

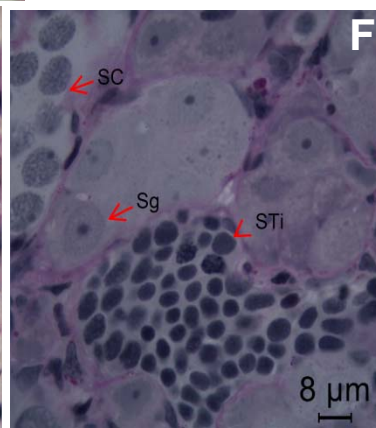
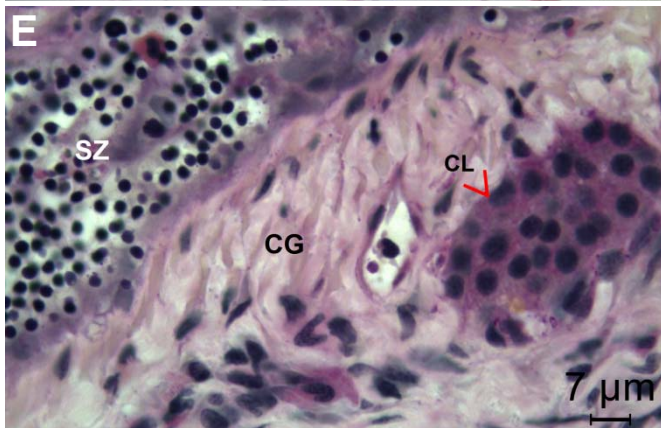
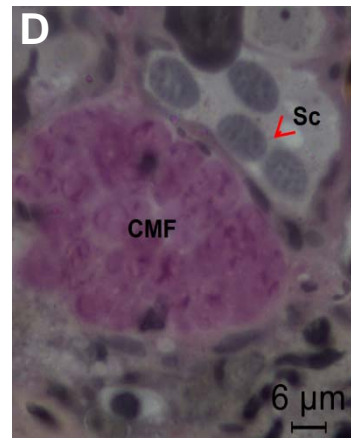
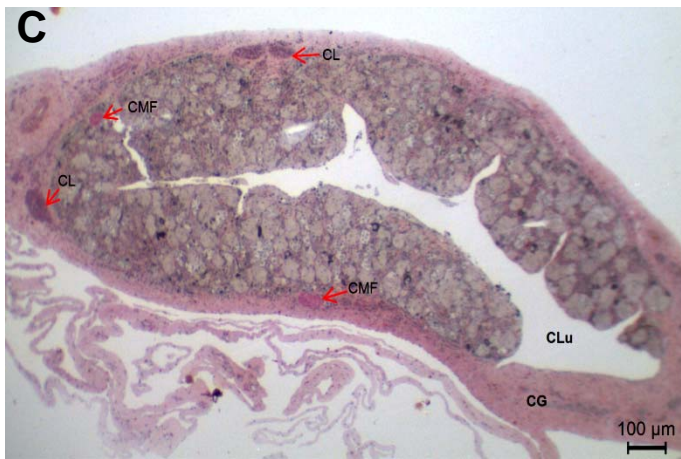
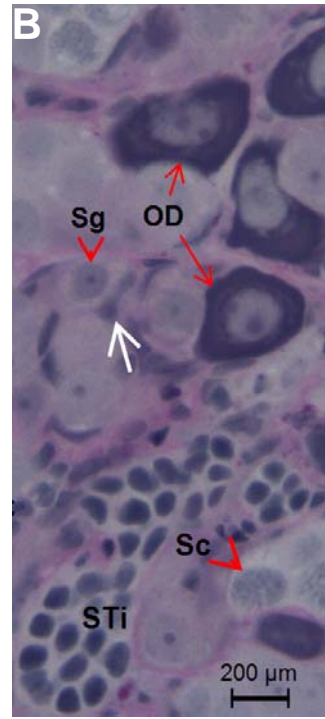
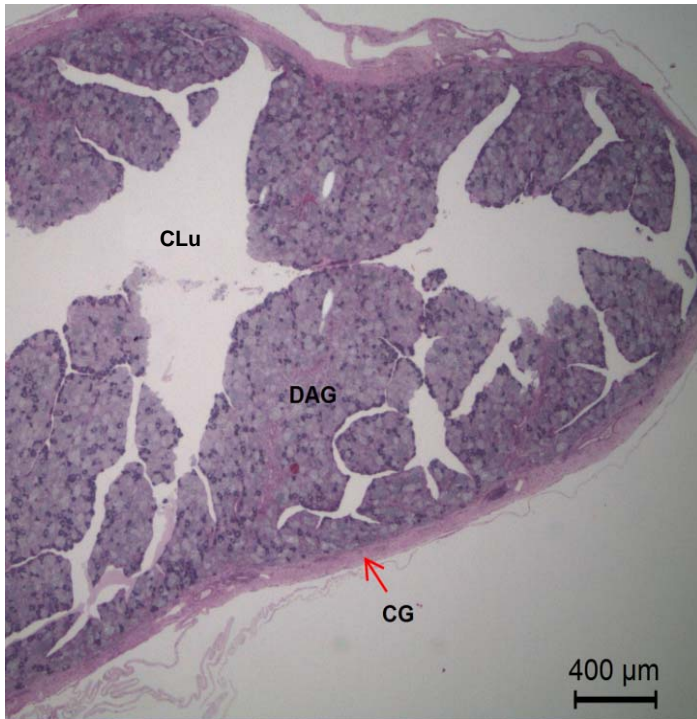


Figura 14: *Epinephelus marginatus* – Localização da hipófise e reações histoquímicas das secções histológicas apresentando as estruturas. Grupo controle. **A)** Localização da hipófise dentro da caixa craniana. Observar a localização da hipófise na base do diencéfalo. **B)** Corte sagital demonstrando o diencéfalo, o pedúnculo hipofisário e a hipófise. Notar que a hipófise estabelece uma relação anatômica e funcional com o hipotálamo através do pedúnculo hipofisário. **C)** Corte sagital demonstrando as divisões da hipófise: neuro-hipófise e adeno-hipófise. Notar que a neuro-hipófise penetra e se ramifica na adeno-hipófise. **D)** Corte transversal da hipófise para demonstrar a neuro-hipófise e a adeno-hipófise. **E)** Corte longitudinal para demonstrar as regiões da adeno-hipófise. Notar que a adeno-hipófise é dividida em três partes de acordo com as características tintoriais das células: “*rostral pars distalis*”, “*proximal pars distalis*”, “*pars intermedia*”. **F)** Regiões da adeno-hipófise. Observar as características tintórias das células. **A:** hipófise (*seta amarela*); diencéfalo (*seta vermelha*). **B – F:** diencéfalo (*DE*); pedúnculo hipofisário (*PH*); hipófise (*H*); neuro-hipófise (*NH*); adeno-hipófise (*AH*); “*rostral pars distalis*” (*RPD*); “*proximal pars distalis*” (*PPD*); “*pars intermedia*” (*PI*); anterior (*A*); posterior (*P*). **B – E:** Coloração Tricrômio de Mallory. **F:** Ácido de Periódico de Schiff.

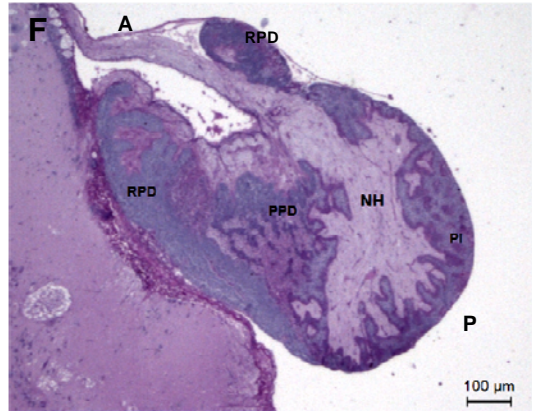
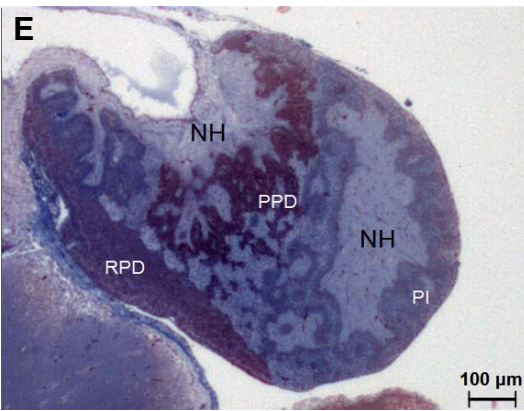
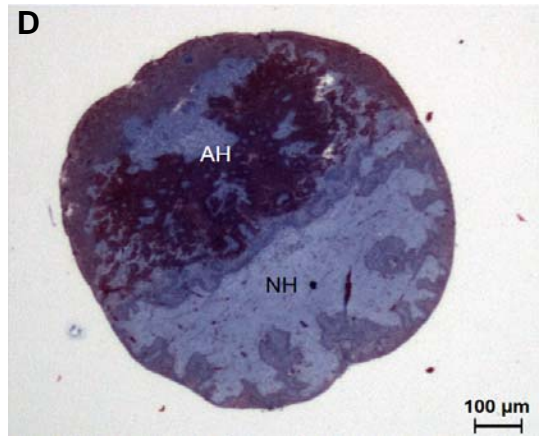
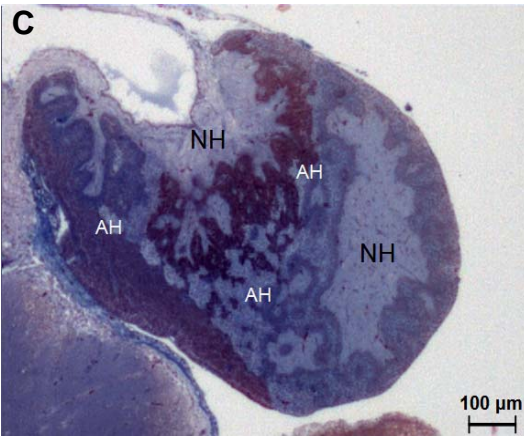
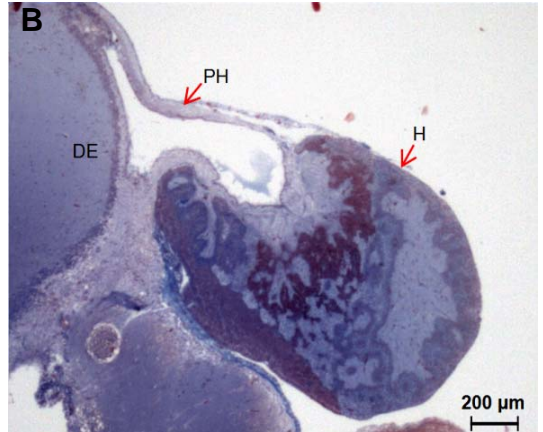
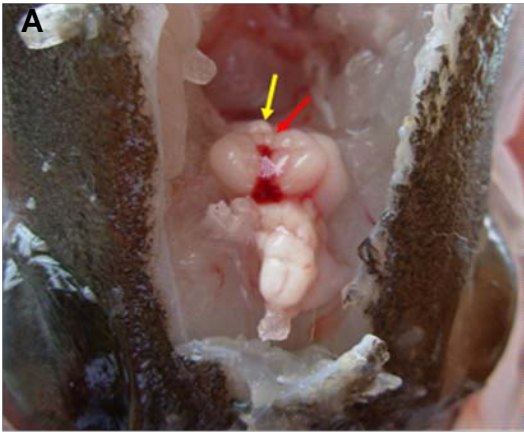


Figura 15: *Epinephelus marginatus* – Reações imunohistoquímicas das secções histológicas apresentando as células somatolactina (SL) e gonadotrópicas. Grupo Controle. **A)** Corte sagital localizando a “*pars intermedia*” da adeno-hipófise pela imunomarcção das células produtoras de somatolactina. Notar que as células produtoras de somatolactina se localizam na periferia dos ramos da neuro-hipófise. **B)** Células produtoras de somatolactina. **C)** Corte sagital demonstrando a imunomarcção das células anti β -FSH. **D)** Corte sagital demonstrando a imunomarcção das células anti β -LH. **E)** Células anti β -FSH. **F)** Células anti β -LH. Notar que as células anti β -FSH e anti β -LH são células globosas, com o núcleo bastante excêntrico e citoplasma abundante. **A – F:** neuro-hipófise (*NH*); adeno-hipófise (*AH*). Células β -FSH (*seta branca*); Células β -LH (*seta vermelha*); Células SL (*seta verde*).

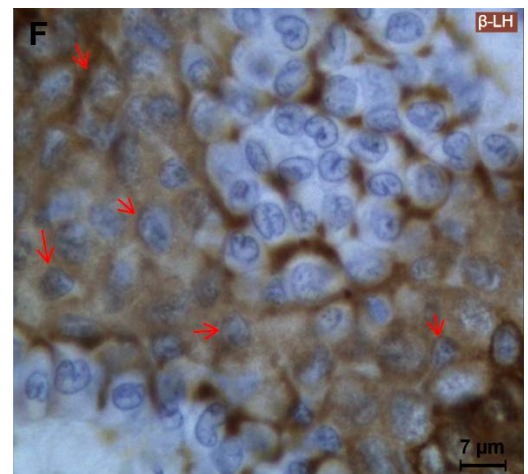
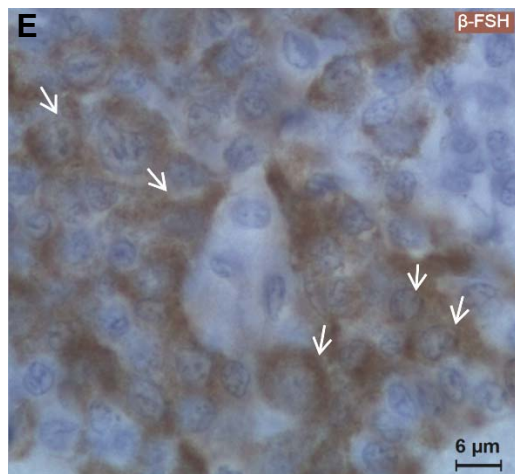
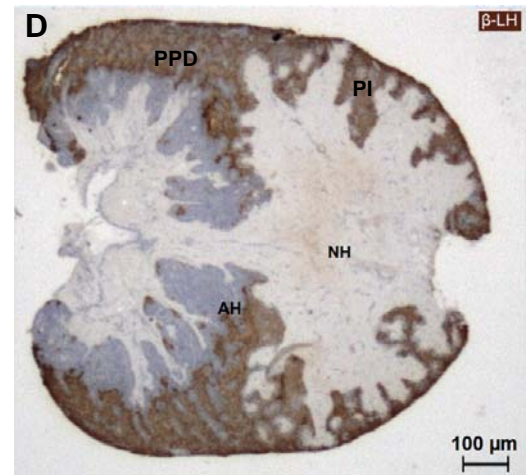
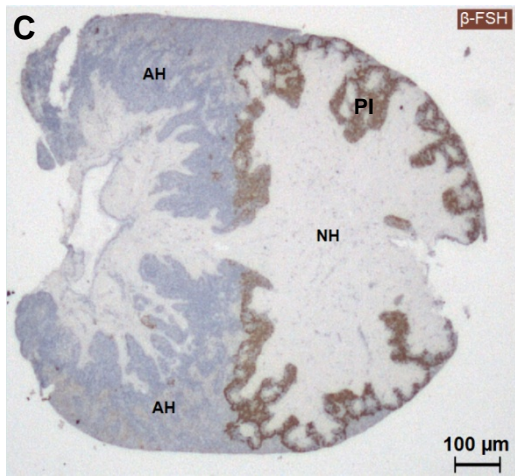
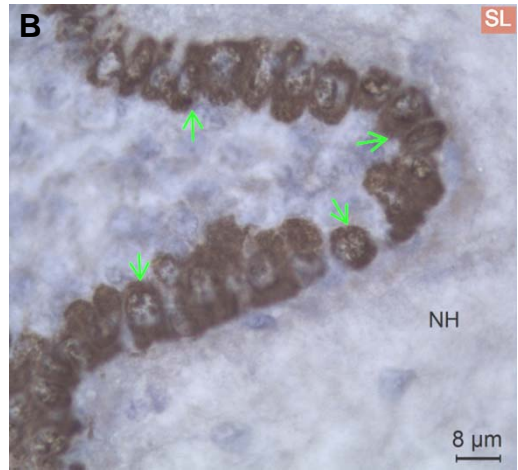
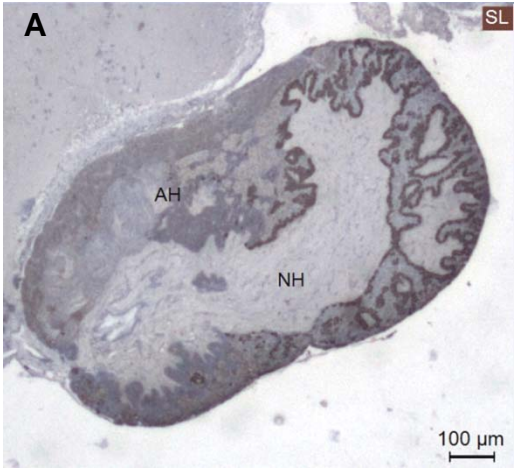


Figura 16: *Epinephelus marginatus* – Reações imunohistoquímicas das secções histológicas apresentando as imunomarcações das células gonadotrópicas em diferentes partes da adeno-hipófise. Grupo controle.

A) Corte sagital da reação imunohistoquímica das células anti β -FSH. Notar que as células anti β -FSH estão localizadas na parte PI. **B)** Corte sagital da reação imunohistoquímica das células anti β -LH. Notar que as células anti β -LH estão localizadas na parte PPD e PI. **C)** Lâmina controle das reações imunohistoquímicas específicas. **A – F:** neuro-hipófise (NH); “rostral pars distalis” (RPD); “proximal pars distalis” (PPD); “pars intermedia” (PI).

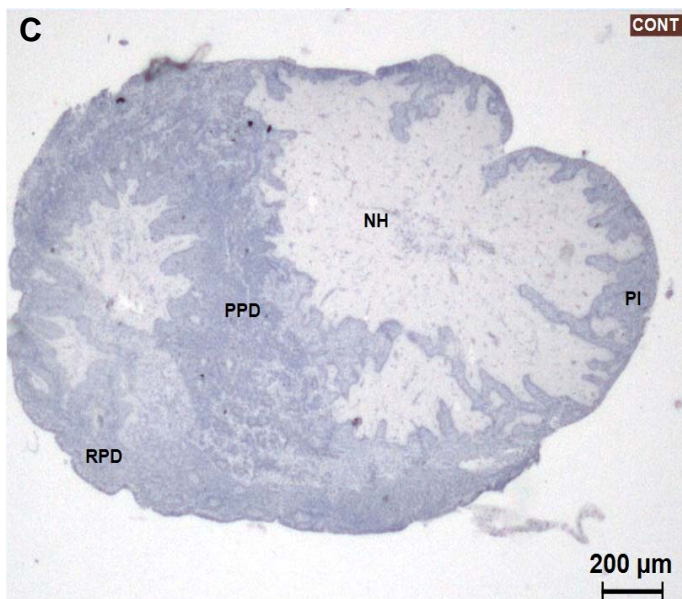
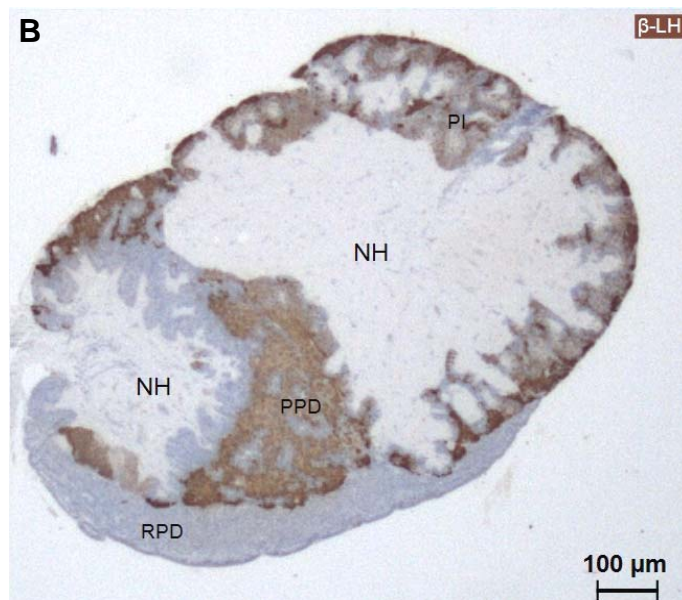
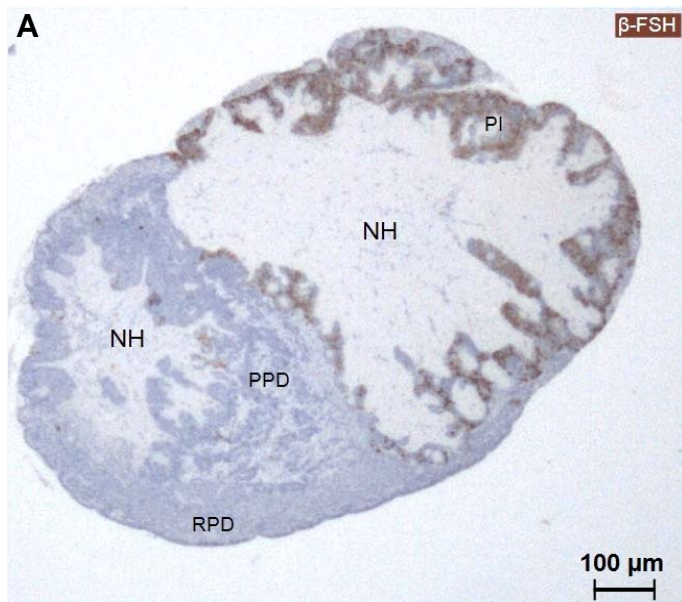


Figura 17: *Epinephelus marginatus* – Reações imunohistoquímicas das secções histológicas apresentando as imunomarcações das células anti β -FSH nos diferentes grupos experimentais após 90 dias de experimento. **A)** Corte sagital da hipófise mostrando a imunomarcação das células anti β -FSH no grupo operado testemunho (*OP*). **B)** Corte sagital da hipófise mostrando a imunomarcação das células anti β -FSH no grupo inibidor de aromatase (*AI*). Notar a imunomarcação mais fraca que os outros grupos experimentais. **C)** Corte sagital da hipófise mostrando a imunomarcação das células anti β -FSH no grupo metiltestosterona e inibidor de aromatase (*MT+AI*). **D)** Corte sagital da hipófise mostrando a imunomarcação das células anti β -FSH no grupo metiltestosterona (*MT*). **A – D:** neuro-hipófise (*NH*); “rostral pars distalis” (*RPD*); “proximal pars distalis” (*PPD*); “pars intermedia” (*PI*).

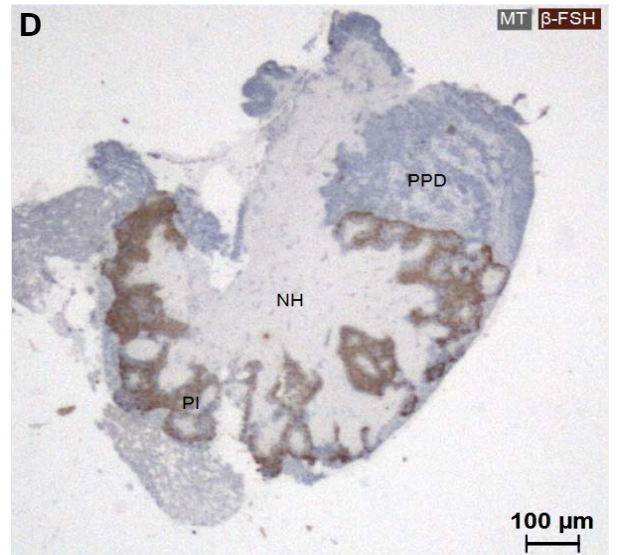
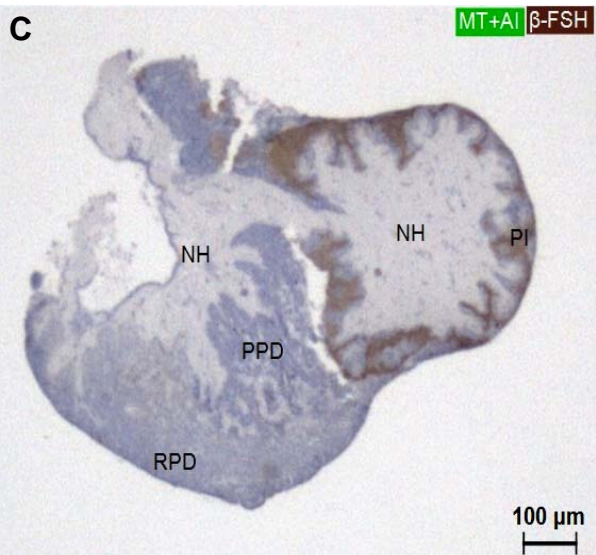
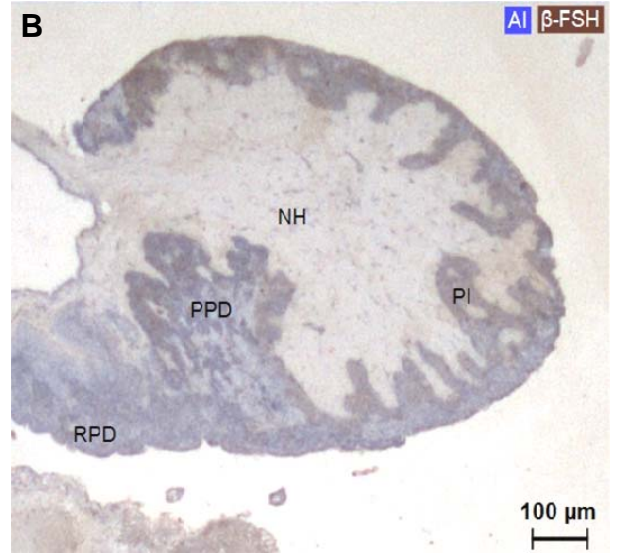
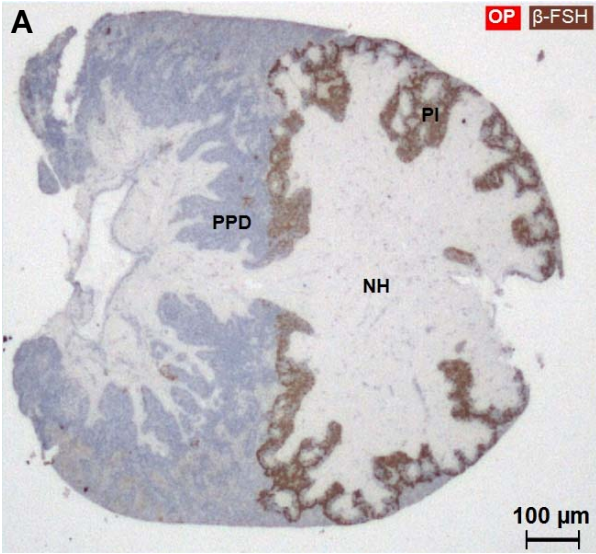


Figura 18: *Epinephelus marginatus* – Reações imunohistoquímicas das secções histológicas apresentando as imunomarcações das células anti β -FSH nos diferentes grupos de tratamento após 90 dias. **A – D:** Corte sagital da hipófise mostrando a imunomarcação das células anti β -FSH no grupo operado testemunho (*OP*). Notar que todos os animais a imunomarcação foi na *PI*. **E)** Corte sagital da hipófise mostrando a imunomarcação das células anti β -FSH no grupo inibidor de aromatase (*AI*). Notar a imunomarcação mais fraca na parte da *PPD* e *PI*. **F)** Corte sagital da hipófise mostrando a imunomarcação das células anti β -FSH no grupo metiltestosterona (*MT*). Notar a imunomarcação mais fraca na parte da *PPD* e pouca marcação na *PI*. **A – F:** neuro-hipófise (*NH*); “*rostral pars distalis*” (*RPD*); “*proximal pars distalis*” (*PPD*); “*pars intermedia*” (*PI*).

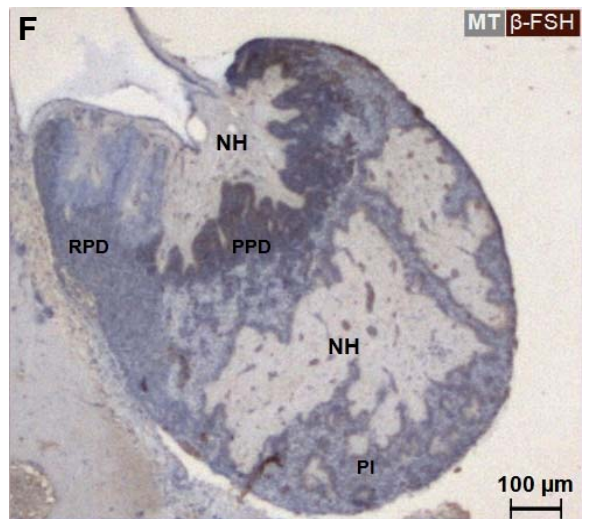
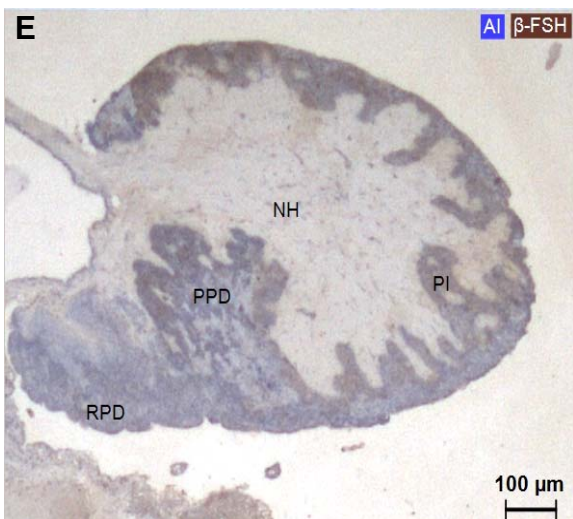
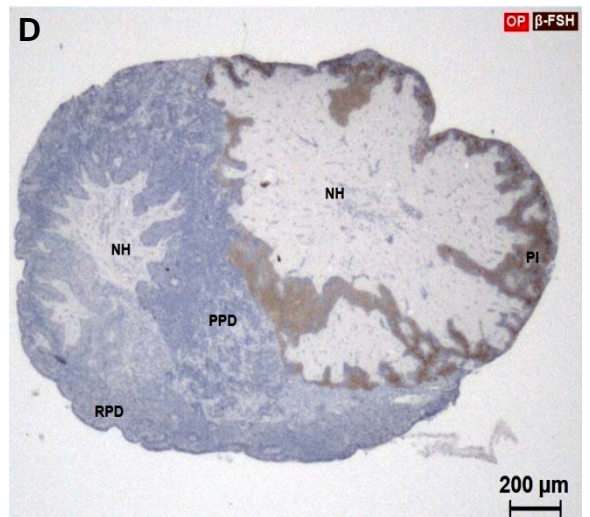
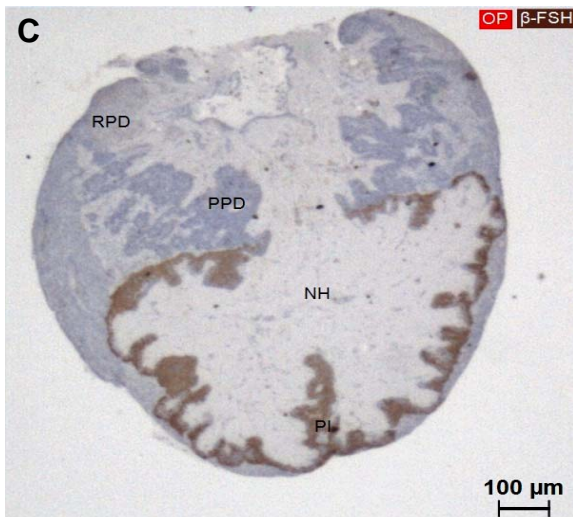
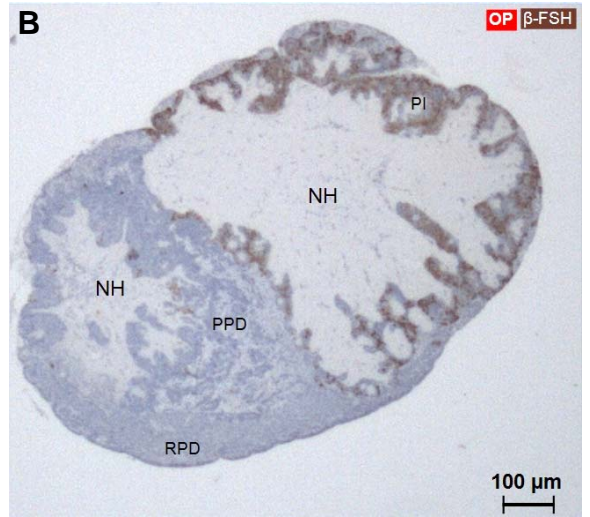
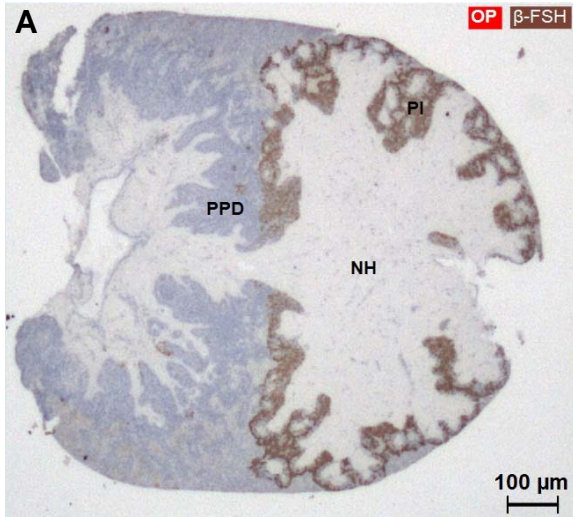


Figura 19: *Epinephelus marginatus* – Reações imunohistoquímicas das secções histológicas apresentando as imunomarcações das células anti β -LH nos diferentes grupos de tratamento após 90 dias. Notar que a imunomarcação foi mais forte e evidente em todos os animais dos diferentes tratamentos na parte da PPD e PI. **A:** Corte sagital da hipófise mostrando a imunomarcação das células anti β -LH no grupo operado testemunho (*OP*). **B)** Corte sagital da hipófise mostrando a imunomarcação das células anti β -LH no grupo inibidor de aromatase (*AI*). **C)** Corte sagital da hipófise mostrando a imunomarcação das células anti β -LH no grupo metiltestosterona e inibidor de aromatase (*MT+AI*). **D)** Corte sagital da hipófise mostrando a imunomarcação das células anti β -LH no grupo metiltestosterona (*MT*). **A – F:** neuro-hipófise (*NH*); “rostral pars distalis” (*RPD*); “proximal pars distalis” (*PPD*); “pars intermedia” (*PI*).

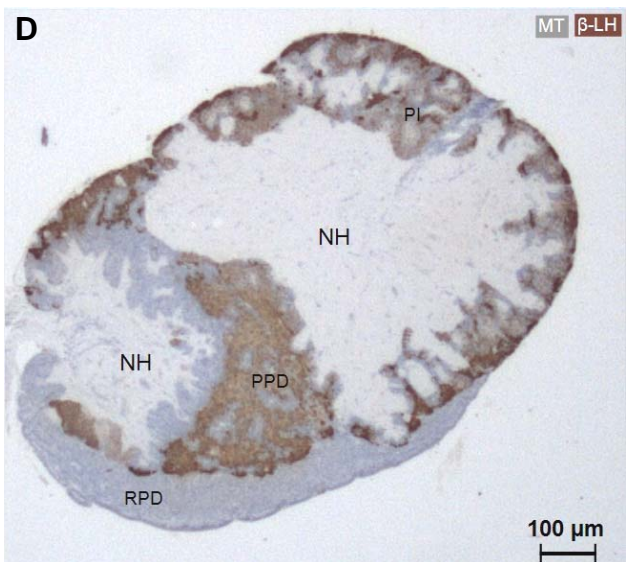
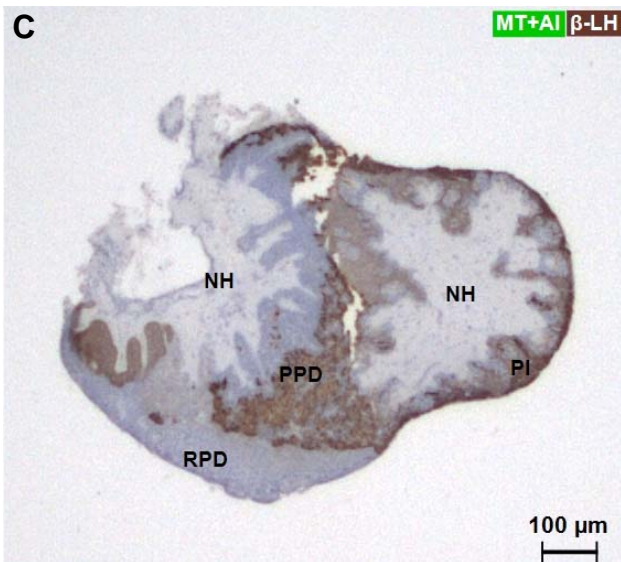
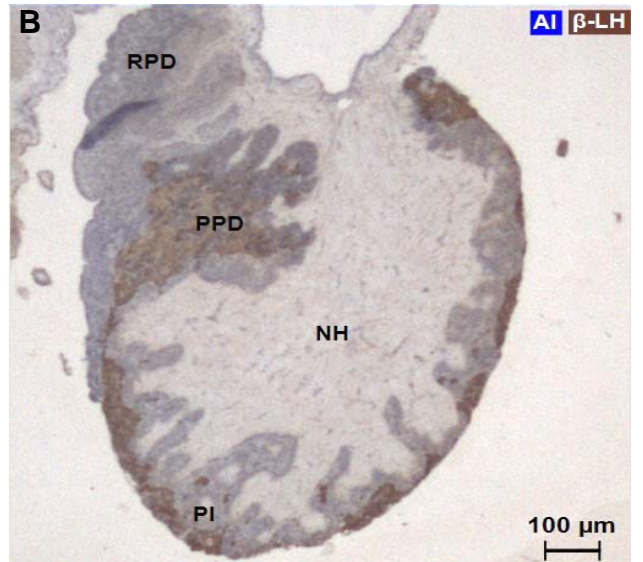
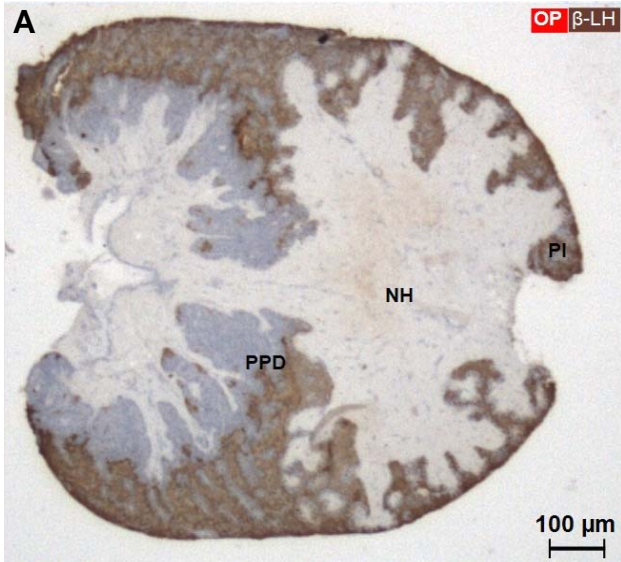
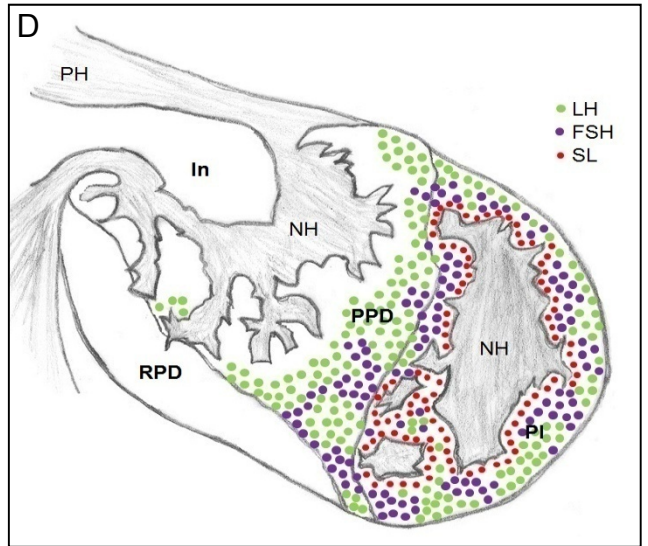
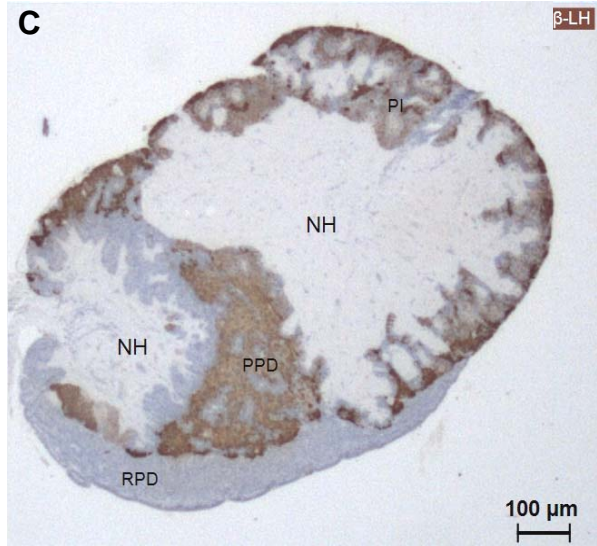
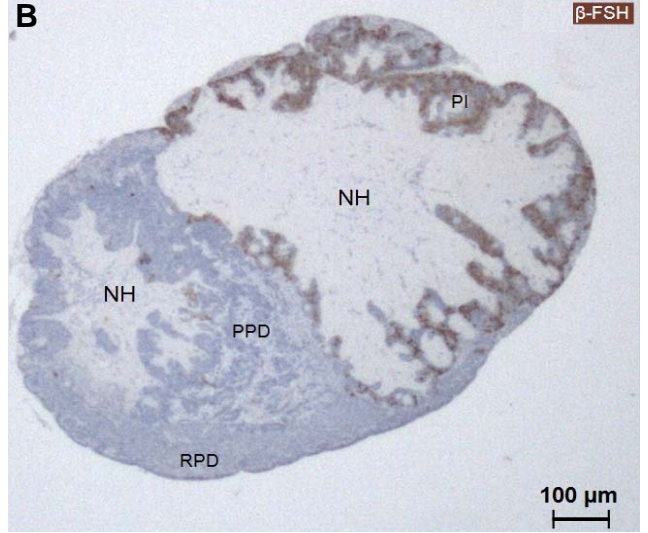
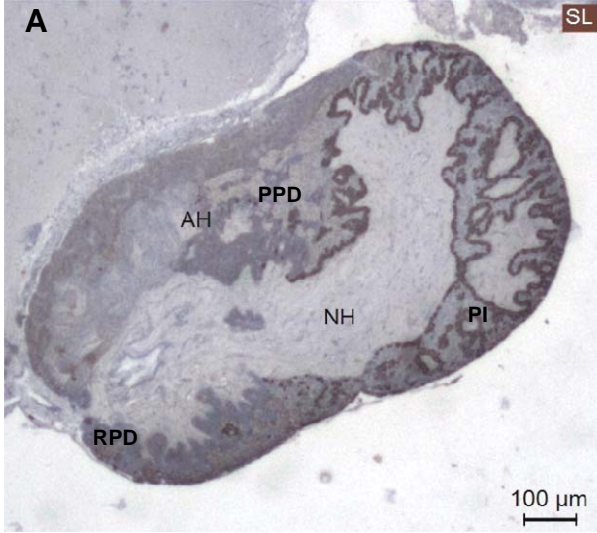


Figura 20: *Epinephelus marginatus* – Reações imunohistoquímicas das secções histológicas apresentando as imunomarcações das células anti β -LH, β -FSH e SL no grupo controle. **A:** Corte sagital da hipófise mostrando a imunomarcação das células anti SL. **B)** Corte sagital da hipófise mostrando a imunomarcação das células anti β -FSH. **C)** Corte sagital da hipófise mostrando a imunomarcação das células anti β -LH. **D)** Esquema mostrando a imunomarcação das células β -LH, β -FSH e SL. **A – D:** neuro-hipófise (NH); adeno-hipófise (AH); “rostral pars distalis” (RPD); “proximal pars distalis” (PPD); “pars intermedia” (PI); infundíbulo (In) ; pedúnculo hipofisário (PH).



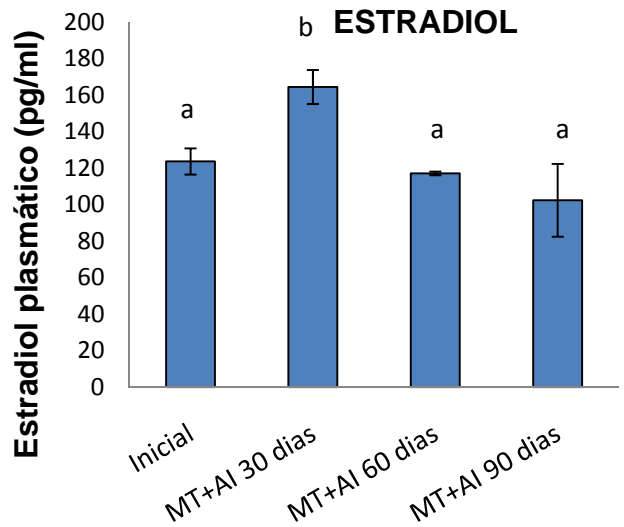
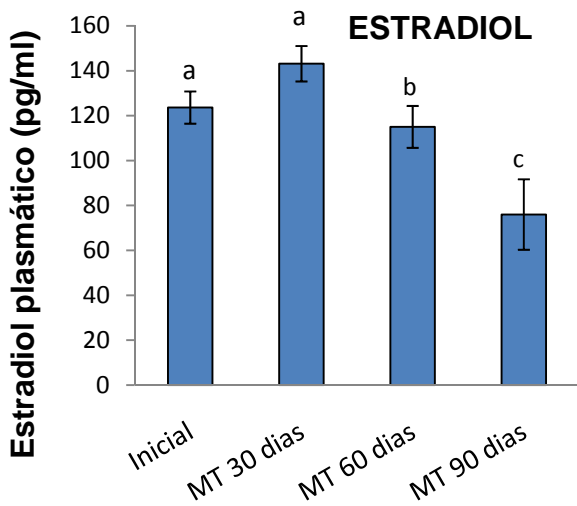
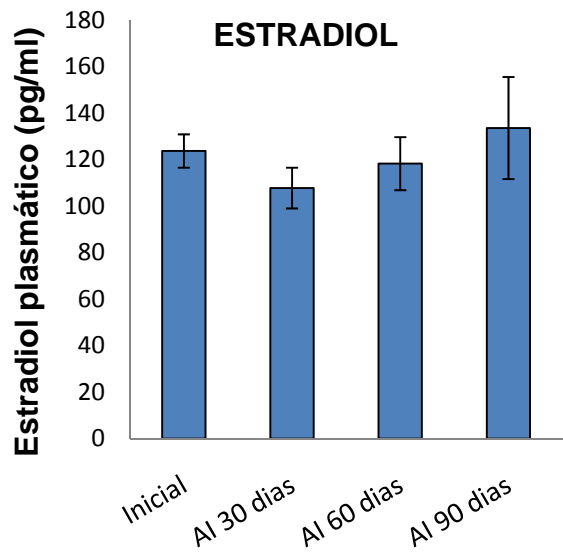
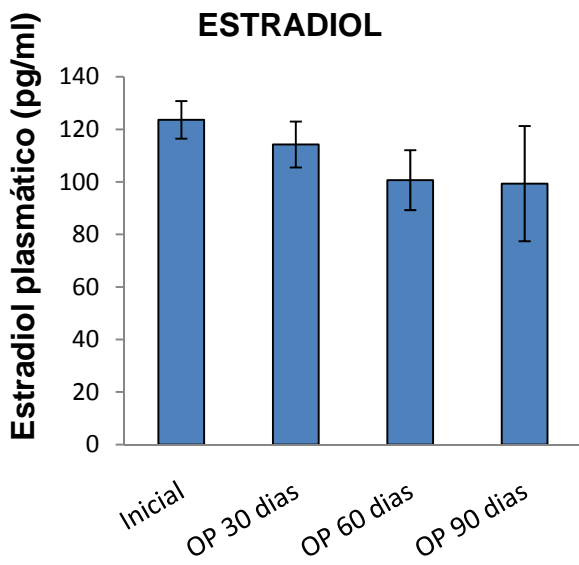


Figura 21: *Epinephelus marginatus* – Perfil plasmático do hormônio esteróide gonadal 17 β -estradiol (E₂) ao longo do período experimental (inicial, 30, 60 e 90 dias) nos diferentes tratamentos. **A)** Grupo operado testemunho (OP). **B)** Grupo inibidor de aromatase (AI). **C)** Grupo metiltestosterona (MT). Notar que a concentração plasmática de estradiol diminui significativamente após 60 e 90 dias experimentais. **D)** Grupo metiltestosterona + inibidor de aromatase (MT+AI). Notar que a concentração plasmática de estradiol aumenta significativamente com 30 dias experimentais. **A – D:** ^{a,b}Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro dos grupos experimentais.

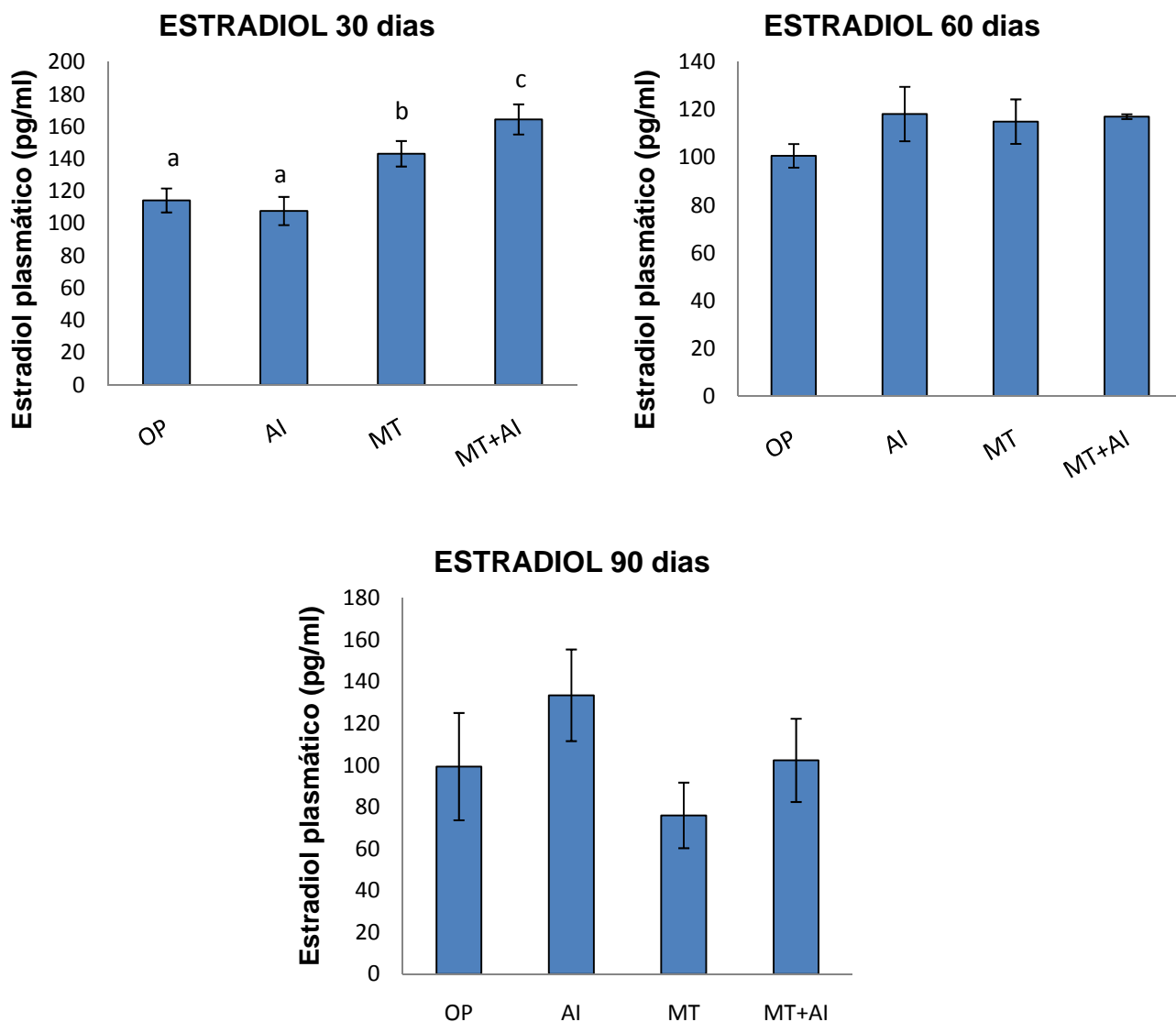


Figura 22: *Epinephelus marginatus* – Perfil plasmático do hormônio esteróide gonadal 17 β -estradiol (E₂) durante o período amostral (30, 60 e 90 dias) nos diferentes tratamentos. **A)** Período amostral após 30 dias de tratamento. Notar o aumento significativo do E₂ nos grupos MT e MT+AI. **B)** Período amostral após 60 dias de tratamento. **C)** Período amostral após 90 dias de tratamento. **A – C):** ^{a,b}Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro dos grupos experimentais.

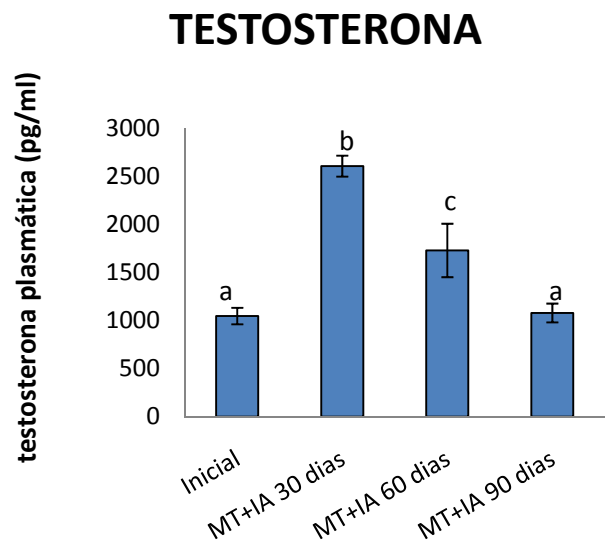
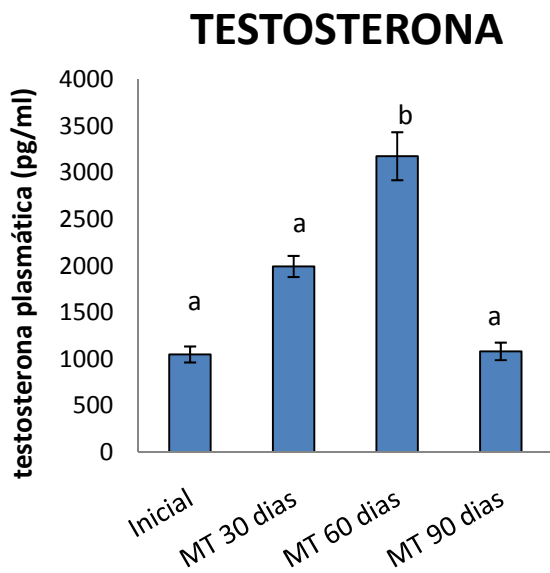
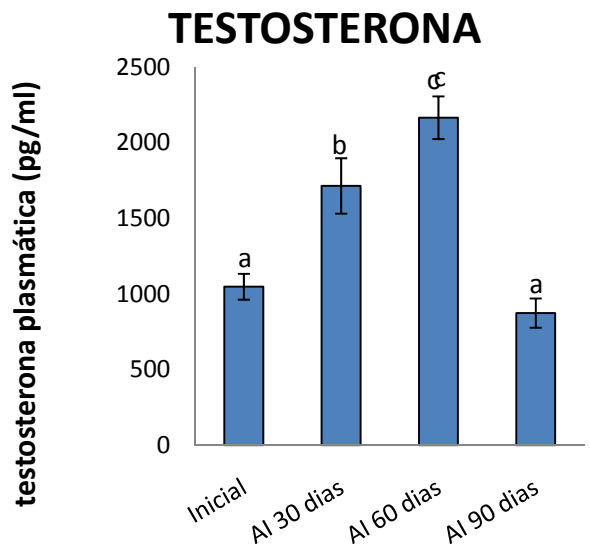
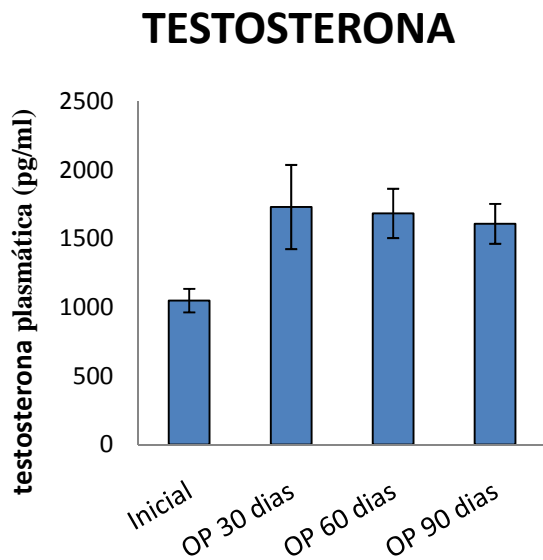
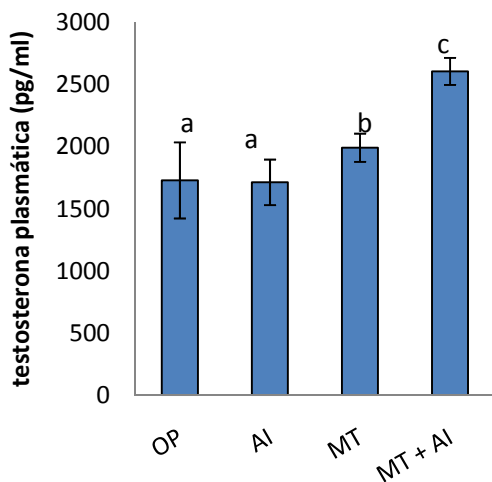
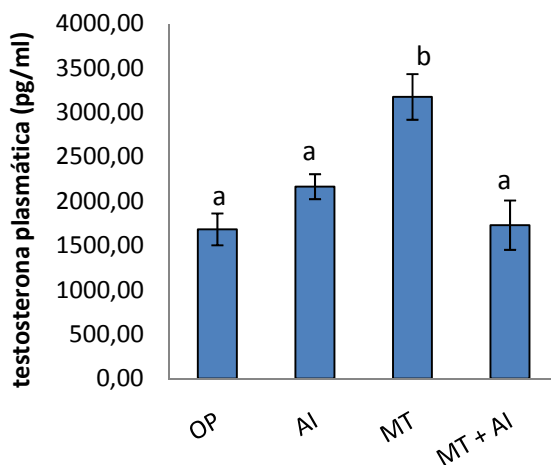


Figura 23: *Epinephelus marginatus* – Perfil plasmático do hormônio esteróide gonadal testosterona (T) ao longo do período experimental (inicial, 30, 60 e 90 dias) nos diferentes tratamentos. **A)** Grupo operado testemunho (OP). **B)** Grupo inibidor de aromatase (AI). Notar que os níveis plasmáticos de testosterona aumentam significativamente após 30 e 60 dias experimentais. **C)** Grupo metiltestosterona (MT). Notar que a concentração plasmática de testosterona aumenta significativamente após 60 dias experimentais. **D)** Grupo metiltestosterona + inibidor de aromatase (MT+IA). Notar que a concentração plasmática de testosterona aumenta significativamente após 30 e 60 dias experimentais. **A – D:** ^{a,b}Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro dos grupos experimentais.

TESTOSTERONA 30 dias



TESTOSTERONA 60 dias



TESTOSTERONA 90 dias

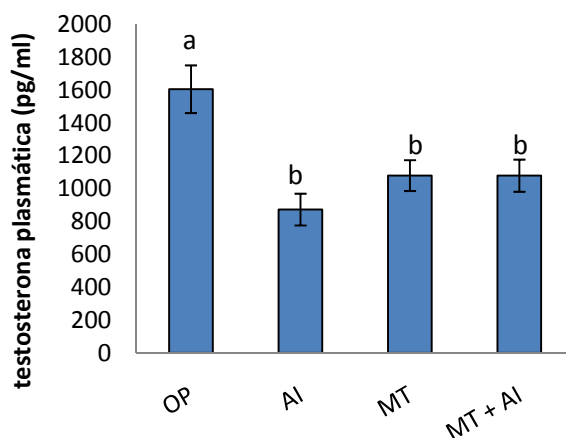


Figura 24: *Epinephelus marginatus* – Perfil plasmático do hormônio esteróide gonadal testosterona (T) durante o período amostral (30, 60 e 90 dias) nos diferentes tratamentos. **A)** Período amostral após 30 dias de tratamento. Notar o aumento significativo da T nos grupos MT e MT+AI. **B)** Período amostral após 60 dias de tratamento. Notar o aumento significativo no grupo MT. **C)** Período amostral após 90 dias de tratamento. Notar que após 90 dias experimentais há uma diminuição significativa em todos os tratamentos, exceto no grupo operado testemunho (OP). **A – C:** ^{a,b}Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro dos grupos experimentais.

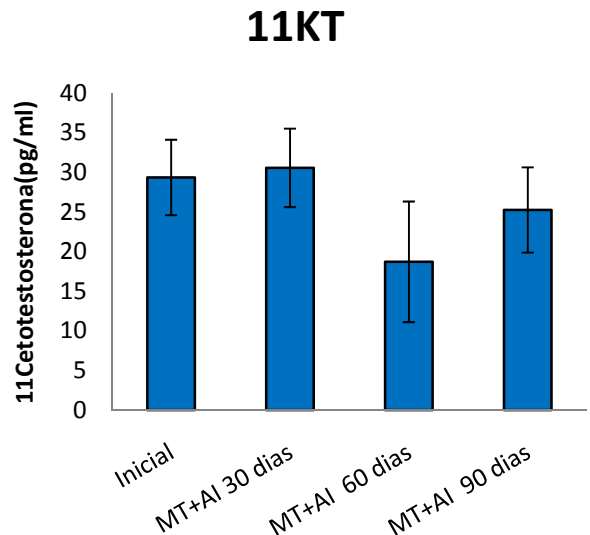
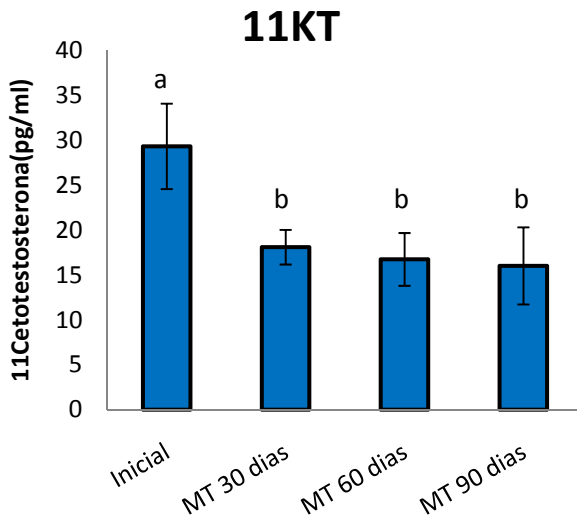
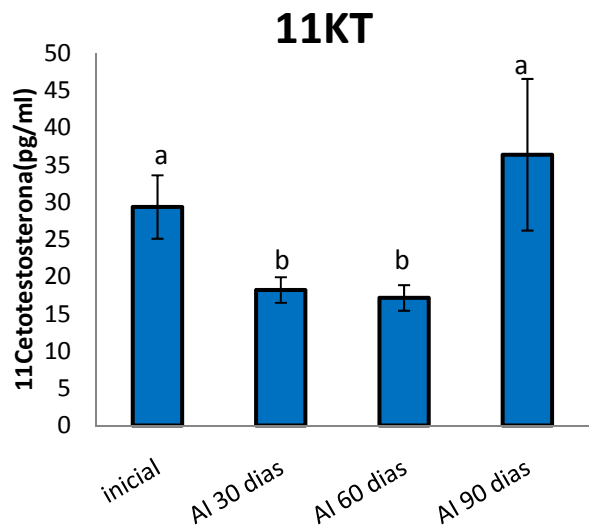
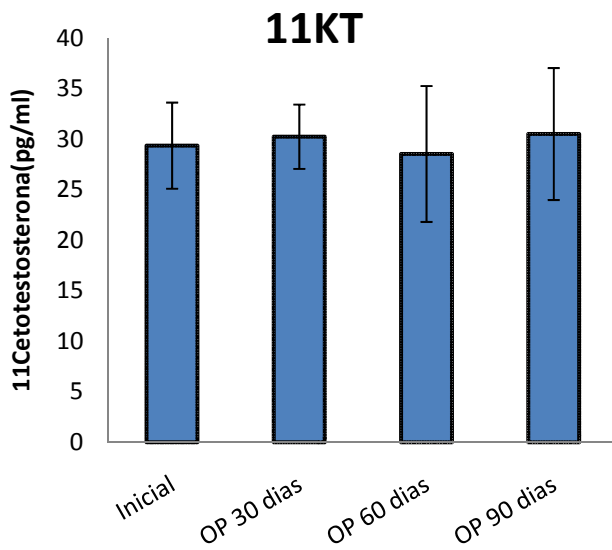


Figura 25: *Epinephelus marginatus* – Perfil plasmático do hormônio esteróide gonadal 11-cetotestosterona (11-KT) ao longo do período experimental (inicial, 30, 60 e 90 dias) nos diferentes tratamentos. **A)** Grupo operado testemunho (OP). **B)** Grupo inibidor de aromatase (AI). Notar que a concentração plasmática de 11-KT diminui significativamente após 30 e 60 dias experimentais e aumentam com 90 dias. **C)** Grupo metiltestosterona (MT). Notar que os níveis plasmático de 11-KT diminuem significativamente após 30, 60 e 90 dias experimentais. **D)** Grupo meitltestosterona + inibidor de aromatase (MT+AI). **A – D:** ^{a,b}Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro dos grupos experimentais.

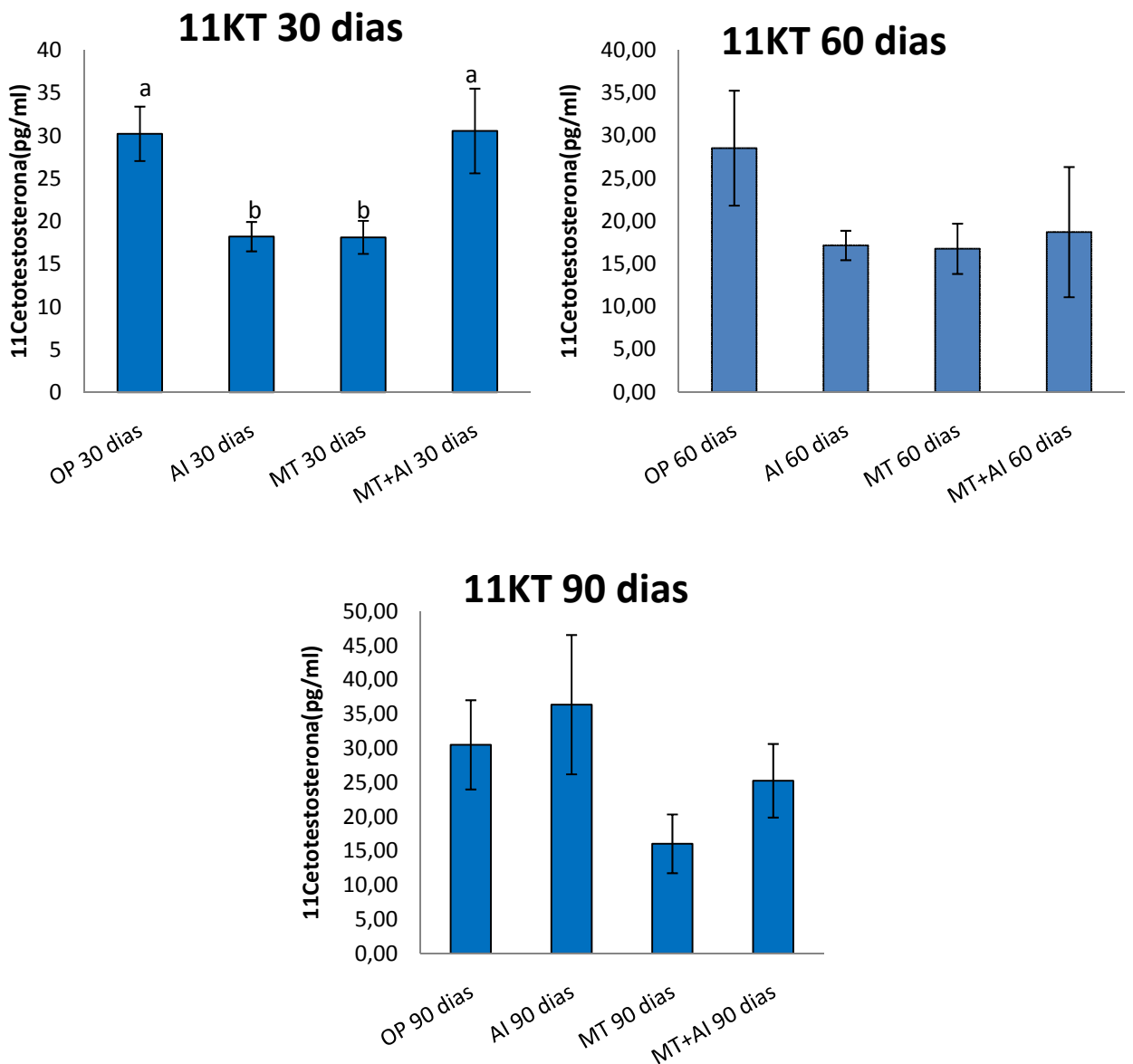


Figura 24: *Epinephelus marginatus* – Perfil plasmático do hormônio esteróide gonadal 11-cetotestosterona (11KT) durante o período amostral (30, 60 e 90 dias) nos diferentes tratamentos. **A)** Período amostral após 30 dias de tratamento. Notar uma diminuição significativa da 11KT nos grupos AI e MT. **B)** Período amostral após 60 dias de tratamento. **C)** Período amostral após 90 dias de tratamento. **A – C):** ^{a,b}Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro dos grupos experimentais.

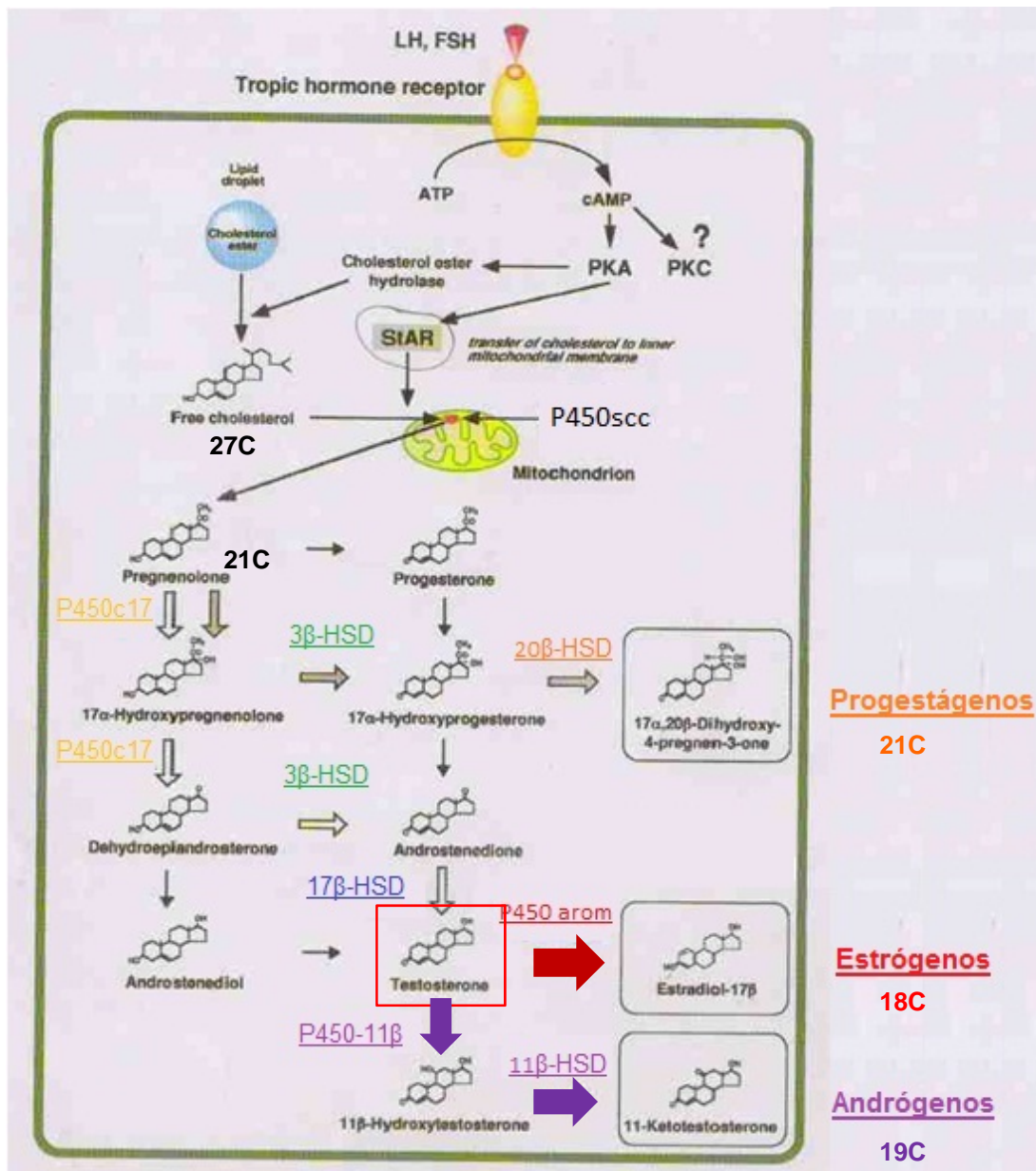


Figura 27: Ilustração demonstrando a via de síntese dos esteróides gonadais em uma célula esteroidogênica. Observar que os precursores para ativação da via esteroidogênica são as gonadotropinas hipofisárias. Notar que a testosterona é um andrógeno precursor para a produção de 17β-estradiol e 11-cetotestosterona. Figura retirada e modificada de Young, *et al.* 2004

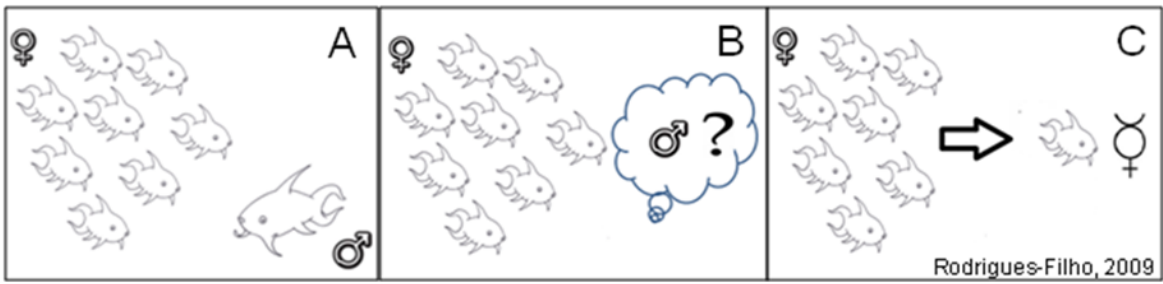


Figura 28: O esquema proposto simboliza como as influências dos estímulos sócio-demográficos podem controlar a mudança de sexo nos indivíduos hermafroditas sequenciais no ambiente natural. Na figura A estão representadas as agregações que segundo Shapiro (1989) ocorrem durante o período reprodutivo; a figura B demonstra a ausência do macho na população durante o período reprodutivo e em consequência desta ausência (figura C), algum estímulo gerado no período reprodutivo induz a inversão sexual das fêmeas dominantes para o próximo período reprodutivo.

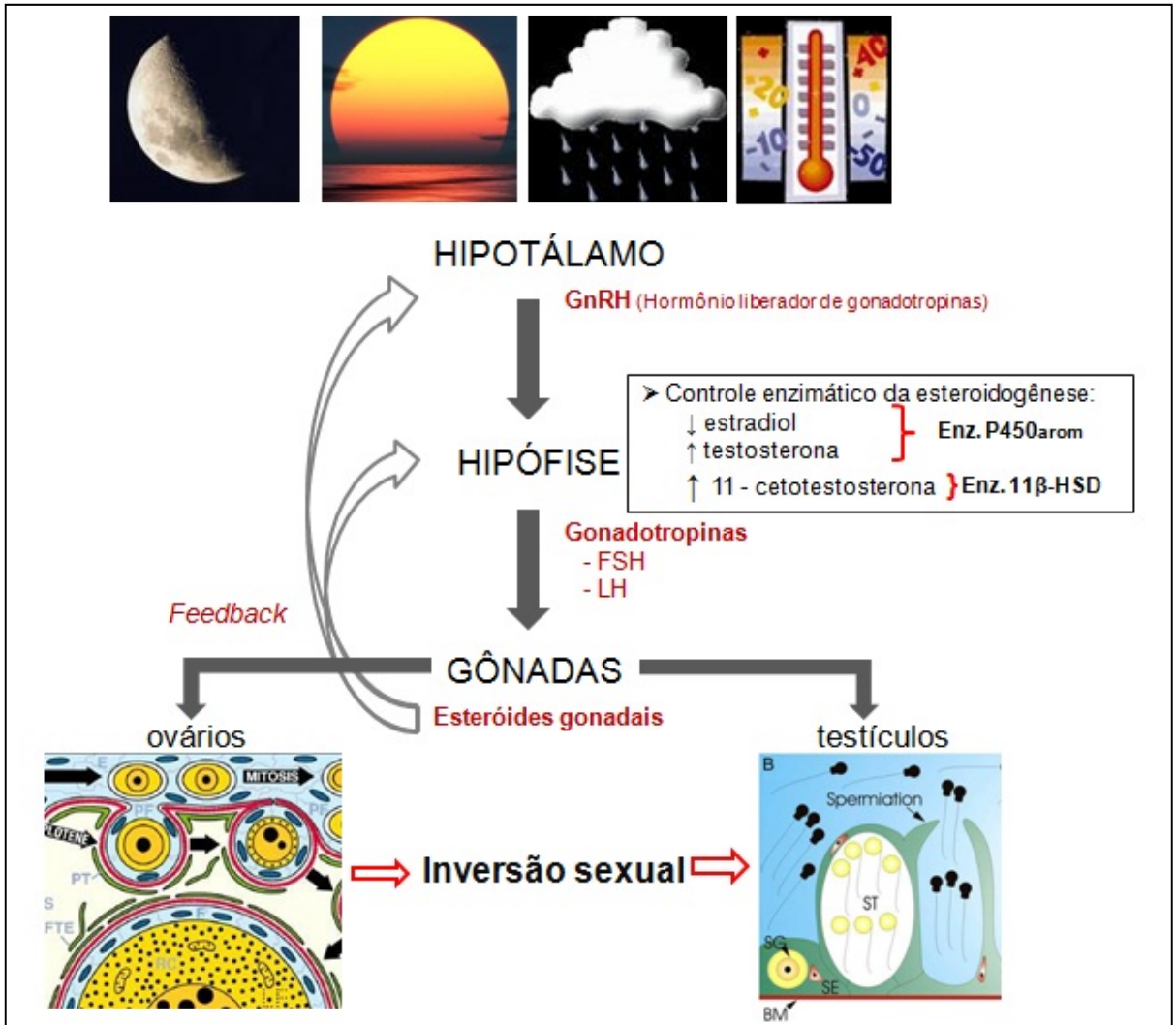


Figura 29: Eixo Hipotálamo – Hipófise – Gônadas. Este eixo exerce, através de complexas vias de *feedback* hormonais, funções que desencadeiam a liberação das gonadotropinas adeno-hipofisárias (FSH e LH), e conseqüentemente, a produção dos esteróides gonadais, que modulam a desestruturação e degeneração do tecido gonadal do primeiro sexo, e o aparecimento, proliferação e maturação das estruturas relacionadas ao segundo sexo. Figuras ilustrando o testículo retirado Nóbrega (2006) e ovário retirado de Grier (2000)

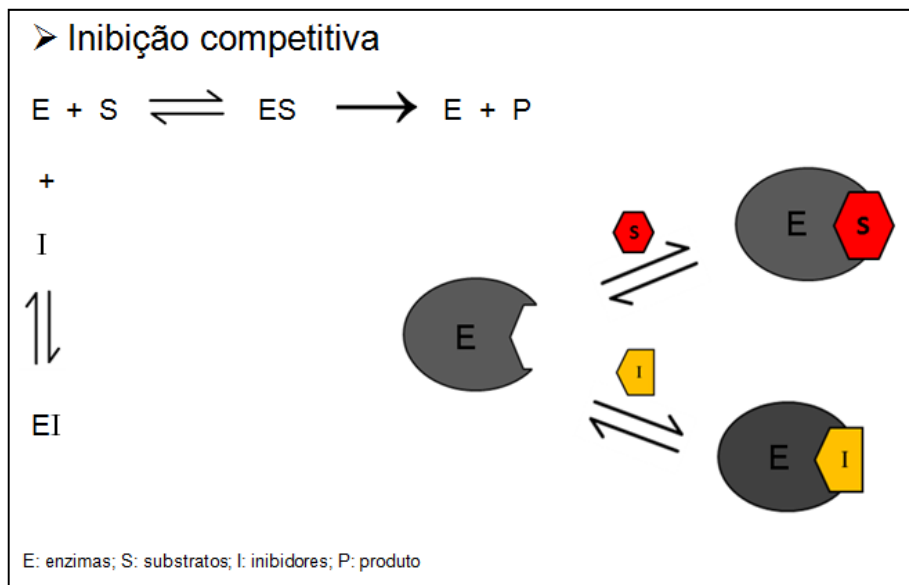


Figura 30: Ilustração demonstrando a inibição da enzimática. Os inibidores de aromatase atuam de maneira competitiva com o substrato pelo o sitio de ligação da enzima P450aromatase, evitando a formação do complexo enzima-substrato (testosterona) o qual se resultaria no produto (17 β - estradiol). Figura retirada e modificada de Nelson & Cox, 2005

10- ANEXOS

Anexo 01

1- Protocolo de análise histoquímica de gônadas (ovários e testículos) e hipófise

1.1- Fixadores

Para a fixação do material biológico foram usados para as gônadas os seguintes fixadores: Bouin acético, Formalina Tamponada a 4%, a 4° C e Karnovsky; para a hipófise foi usado apenas o Bouin. Todos os materiais foram fixados por 24 horas e após esse período as gônadas foram transferidas e conservadas em álcool 70%.

- **Preparo dos fixadores**

- Bouin acético:

- Ácido pícrico saturado.....750ml
 - Formol a 40%.....250ml
 - Ácido acético glacial.....50ml

- Formalina tamponada:

- Formol a 40%.....10ml
 - Tampão.....90ml

- Solução tampão

- Monofosfato de sódio.....3,5g
 - Difosfato de sódio6,5g
 - Água destilada.....1000ml

-Karnovsky:

Paraformaldeído a 8%.....100 ml
Glutaraldeído a 25%..... 17 ml
Tampão fosfato de Sorensen (pH 7,2).....93 ml

➤ *Preparo da solução de Paraformaldeído 8% (para 100ml)*

Foi colocado em um Becker 90ml de água destilada, aquecida a 60°C (controlando com termômetro), acrescentado 8g de paraformaldeído agitando a solução até dissolver todo o paraformaldeído; em seguida foi gotejada solução de hidróxido de sódio (duas pastilha de hidróxido de sódio (NaOH) dissolvida em 8ml de água destilada), até que a solução ficasse transparente, sendo então o volume completado até 100 ml.

➤ *Preparo tampão fosfato de Sorensen*

Solução A

Fosfato de sódio Monobásico NaH_2PO_4 27,80 g
Água destilada..... 1000 ml

Solução B

Fosfato de sódio Dibásico Na_2HPO_4 28,39g
Água destilada..... 1000 ml

Obs.: Solução de uso (pH 7,2)

Solução A.....28ml

Solução B.....72ml

1.1- Inclusão do material biológico

Para a inclusão do material biológico, os tecidos fixados passaram por imersão em uma bateria de álcool e xilol para a desidratação desse material e em seguida, todos os tecidos foram infiltrados e incluídos em *paraplast* (*Erv-Plast* – Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda), para posterior secção no micrótomo (Leica RM 2255), a desidratação constou dos seguintes passos:

- Desidratação do material:

- Álcool 95%;
- Álcool absoluto (2 vezes);
- Xilol (2 vezes);
- *Paraplast* (3 vezes).

Para cada passo descrito acima, a duração de cada imersão foi de 1 hora. Esse procedimento foi realizado para a hipófise, ovários e testículos.

1.2- Secção do material biológico

A secção do material biológico foi realizada em micrótomo (Leica RM 2255) com uso de lâminas descartáveis. As secções foram obtidas com 5µm de espessura para os tipos de material biológico embocado no *paraplast* e com 3µm no material embocado em resina.

Os cortes obtidos foram montados em lâminas com poli-lisina (*Poly-Lysine Solution Sigma Diagnostics INS, St, Louis M. O. USA*) diluída em 1:5 em água destilada, esta solução auxilia a fixação dos cortes nas lâminas. Em seguidas, iniciou-se o procedimento de coloração do tecido.

É importante salientar que para as secções da hipófise foram realizadas secções seriadas do material biológico.

1.3- Técnicas rotineiras de colorações

1.3.1– Hematoxilina e Eosina

As lâminas montadas com os tecidos passaram por imersão nas seguintes soluções e corantes, nos respectivos tempos:

- Hidratação do material:

- Xilol (2 vezes) – 3 minutos cada;
- Álcool absoluto – 3 minutos;
- Álcool 96% – 3 minutos;
- Álcool 70% – 3 minutos;
- Lavar em água corrente – 3 minutos;

- Coloração do material:

- Hematoxilina – 5 minutos;
- Lavar em água corrente – 3 minutos;
Obs.: Diferenciar em Álcool-Ácido clorídrico (1ml de ácido clorídrico para 99 ml de álcool a 70%), até que os núcleos fiquem bem diferenciados;
- Lavar em água corrente – 3 minutos;
- Eosina – 2 minutos;

- Desidratação e montagem:

- Álcool a 96% - 3 minutos;
- Álcool absoluto - 3 minutos;
- Álcool absoluto + Xilol (proporção de 1:1) - 3 minutos;
- Xilol (2 vezes) - 3 minutos cada;
- Montagem com goma Damar.

Este tipo de coloração foi realizado para os ovários e testículos.

- **Preparação da solução Hematoxilina de Harris**

- Hematoxilina..... 10 g
- Óxido de mercúrio..... 5 g
- Sulfato de alumínio e potássio..... 200 g
- Água destilada.....1900 ml
- Álcool absoluto..... 100 ml

- Preparo:

- 1) Dissolver a hematoxilina no álcool;
- 2) Dissolver o sulfato na água quente;
- 3) Juntar a hematoxilina já dissolvida no sulfato em água quente;
- 4) Aquecer a solução rapidamente;
- 5) Colocar o óxido lentamente.

- Hematoxilina para uso:

Hematoxilina.....200 ml

Ácido acético glacial.....4 ml

- **Preparação da solução de Eosina**

- Solução estoque de Eosina 1%:

Eosina.....1 g

Água..... 100 ml

- Solução estoque Floxina B 1%:

FloxinaB.....1 g

Água.....100 ml

- Solução para uso:

Eosina 1 %.....100 ml.....20 ml.....50 ml

Floxina 1%.....10 ml.....2 ml.....5 ml

Álcool et. 95%.....780 ml.....158 ml.....390 ml

Ácido acético.....4 ml.....0,8 ml.....2 ml

1.3.2– Metanil Yellow + PAS (Resina)

As lâminas montadas com os tecidos passaram por imersão nas seguintes soluções e corantes, nos respectivos tempos:

- Passar os cortes em álcool 90%
- Hidratar em água destilada
- Ácido Periódico 1% por 10 minutos
- Lavar em três trocas de água destilada
- Reativo de Schiff durante 1 hora
- Lavar em água corrente 10 minutos
- Hematoxilina férrica por 6 minutos
- Lavar em água corrente 10 minutos
- Metanil Yellow por 2 minutos
- Desidratar e montar

- **Preparação da solução de Metanil Yellow**

- Solução A:

Metanil yellow..... 0,1g
Água destilada.....100 ml

- Solução B:

Acido Acético Glacial..... 0,5 ml
Água destilada.....100 ml

- Solução Corante:

Solução A.....10 ml
Solução B..... 25 ml
Água destilada.....15 ml

1.3.3- Tricrômio de Mallory

As lâminas montadas com os tecidos passaram por imersão pelas seguintes soluções e corantes, nos respectivos tempos:

- Hidratação do material:

Mesmo procedimento descrito no item 1.3.1 (hematoxilina e Eosina);

- Coloração do material:

- Solução A (Fucsina ácida) – 5 minutos;
- Solução B (Mallory) – 7 minutos;
- Diferenciar em álcool absoluto até sair o excesso de corante.

- Desidratação e montagem:

Mesmo procedimento descrito no item 1.3.1 (Hematoxilina e Eosina);

Este tipo de coloração foi realizado apenas para a hipófise.

- **Preparo das soluções:**

- solução A:

Fucsina ácida1g
Água destilada.....100ml

- solução B:

Azul de anilina.....0,5g
Laranja G.....2g
Ácido fosfotungstico.....1g
Água destilada.....100ml

1.3.4 – Ácido Periódico de Schiff (P.A.S)

As lâminas montadas com os tecidos passaram por imersão pelas seguintes soluções e corantes, nos respectivos tempos:

- Hidratação do material:

Mesmo procedimento descrito no item 1.3.1 (Hematoxilina e Eosina);

- Coloração do material:

- Ácido Periódico - 10 minutos;
- Lavar em água corrente - 3 minutos;
- Reativo de Schiff - 30 minutos;
- Lavar em água corrente - 3 minutos;
- Hematoxilina - 2 minutos;
- Lavar em água corrente - 3 minutos;

- Desidratação e montagem:

Mesmo procedimento descrito no item 1.3.1 (Hematoxilina e Eosina);

Obs.: Este tipo de coloração foi realizado apenas para a hipófise.

• **Preparação das soluções**

- Ácido Periódico:

Ácido Periódico.....1g
Água destilada.....100ml

- Reativo de Schiff

Fucsina básica.....1,5g
Metabissulfito de sódio.....9g
Ácido clorídrico.....3ml
Água destilada.....200ml

- Preparo:

- 1) Dissolver a Fucsina básica na água destilada e ferver por 5 minutos (no momento da fervura abaixar o fogo);
- 2) Retirar do fogo e acrescentar 9g de metabissulfito de sódio;
- 3) Agitar a solução por 1h e 30 minutos;
- 4) Deixar por 2h em repouso;

- 5) Filtrar e colocar 3ml de ácido clorídrico;
- 6) Armazenar em frasco escuro, em ambiente escuro por 24h para a descoloração da solução até adquirir a cor de palha.
- 7) Acrescentar 0,25g de carvão ativado para cada 100ml de solução, agitar e deixar descansando.
- 8) Filtrar e armazenar na geladeira para uso.

Anexo 2

1- Protocolo de análises de imuno-histoquímica da hipófise

1.1- Inclusão do material biológico

Este procedimento foi o mesmo utilizado para a inclusão do material, descrito no Anexo 01, item 1.1 (Inclusão do Material Biológico).

1.2- Secção do material biológico

Este procedimento foi o mesmo utilizado para a inclusão do material, descrito no Anexo 01, item 1.2 (Secção do Material Biológico).

1.3 Técnicas de Imuno-histoquímica

Para as reações de imuno-histoquímicas, as secções histológicas seriadas obtidas foram processadas de acordo com o método SABC (*Streptavidin-Biotin-peroxidase Complex – Dako Cytomation LSAB2 R System HRP Liquid DAB – Ref. 0673*), seguindo este protocolo:

- Xilol (60°C)20 minutos cada;
- Xilol (2 vezes) 10 minutos cada;
- Álcool absoluto..... 10 minutos;
- Álcool 96% 10 minutos;
- Álcool 70% 10 minutos;
- Lavar em água corrente..... 10 minutos;
- Recuperação antigênica em vaporeira (90°C) 10 minutos;
- Repouso em tampão citrato (0,01M) (T^o ambiente).....10minutos;
- Lavar em água destilada (2 vezes) 10 minutos cada;
- PBS (*fosfate buffer saline*) com pH 7,2-7,6 (2 vezes).....15 minutos cada;

- Bloqueio da peroxidase endógena, 3% H₂O₂ diluído em PBS (*fosfate buffer saline*) (escuro).....1 hora;
- PBS (2 vezes)..... 10 minutos;
- Bloqueios dos sítios inespecíficos, leite mólico 5 % (leite em pó diluído em PBS)..... 1 hora minutos;
- Incubar com os anticorpos primários (tabela 03) a 4° C 24horas;
- PBS (3 vezes)..... 10 minutos;
- Anticorpo secundário Biotinilado (*Dako Cytomation LSAB2 R System HRP*) (temperatura ambiente)1 hora;
- PBS (2 vezes)..... 10 minutos cada;
- Complexo Estreptavidina + biotina + Peroxidase (SABC) 1 hora;
- PBS (2 vezes)..... 10 minutos cada;
- Revelar ao microscópio com DAB (3,3 – diaminobenzidina) (*Dako Cytomation LSAB2 R System HRP*).....rapidamente;
- Passar em Hematoxilina Mayer..... 2 a 3 minutos;

- Desidratar e montar as lâminas:

- Álcool a 70%..... 5 minutos;
- Álcool a 96%..... 5 minutos;
- Álcool absoluto (2 vezes) 5 minutos cada;
- Álcool absoluto + Xilol (proporção de 1:1) 10 minutos;
- Xilol (2 vezes) 5 minutos cada;
- Montagem com goma Damar.

ANEXO 3

1 – Protocolo de Análises dos Esteróides Gonadais (17 β -estradiol, testosterona e 11ceto-testosterona).

1.1 – Protocolo de Análise para 17 β -estradiol.

Para análise do hormônio estradiol, utilizou-se o “kit” comercial de Elisaimunoensaio para Estradiol EIA (INTERKIT), contendo:

- 6 padrões para Estradiol;
- 2 controles para Estradiol;
- Anticorpo anti-estradiol de coelho;
- Conjugado de Biotina Estradiol;
- Solução Cromógena de Tetrametilbenzidina (TMB);
- Solução de interrupção (STOP);
- Placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, totalizando 96 poços.

As amostras foram descongeladas até atingir temperatura ambiente e homogeneizadas para o início do procedimento da análise.

O suporte com as tiras foi marcado para posterior identificação das amostras, colocando nas primeiras cavidades, 25 μ l dos 6 padrões fornecidos pelo kit (0; 10; 30; 100; 300 e 1000 pg/ml). Em seguida, 25 μ l do controle 1 e 2 e das amostras foram colocados nos poços seguintes. Essa análise foi feita em duplicata para os padrões, para os controles e para as amostras.

Foi adicionado 100 μ l da solução de Conjugado de Biotina em cada poço das amostras e reagentes (padrões e controle).

Foi adicionado 50 μ l de antisoro em cada poço, agitando a placa levemente por 5 segundos. Posteriormente, a placa foi colocada no agitador, onde ficou por 90 minutos na velocidade de 170rpm. Depois de agitado, desprezou-se o

conteúdo da placa, lavando cada poço com 300µl de água destilada. A lavagem foi realizada 5 vezes em cada poço.

Foi adicionado 100µl de Solução Cromógena TMB (solução de coloração da reação) em todos os poços e colocada no agitador novamente por 10 minutos. A placa foi coberta com papel alumínio antes de ser colocada no agitador, para que a luz e o oxigênio não interferissem na reação.

Após todo esse procedimento, foi adicionado 100µl de solução STOP (solução de interrupção da reação, de composição ácida) em cada poço, esperando-se por aproximadamente 15 segundos para a leitura final e consequentemente para obtenção dos resultados.

As amostras, os controles e os padrões foram lidos em uma leitora de microplaca (Molecular Devices, modelo SpectraMax 250) a um comprimento de onda de 450nm.

1.2 – Protocolo de Análise para Testosterona.

Para análise do hormônio testosterona, utilizou-se o “kit” comercial de Elisamunoensaio, para Testosterona (INTERKIT) contendo:

- 6 padrões para Testosterona;
- 2 controles para Testosterona;
- Conjugado de Biotina Testosterona;
- Reagente anti-testosterona de coelho;
- Solução Cromógena de Tetrametilbenzidina (TMB);
- Solução de interrupção (STOP);
- Placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, totalizando 96 poços.

O procedimento do ensaio foi o mesmo realizado no item 1.1 (Protocolo de análise de Estradiol). Os valores dos padrões do kit para testosterona são de 0; 0.1; 0.5; 2; 6 e 18 ng/ml. As amostras, os controles e os padrões foram lidos também em uma leitora de microplaca (Molecular Devices,, modelo SpectraMax 250) a um comprimento de onda de 450nm.

1.3 – Protocolo de Análise para 11ceto-Testosterona.

Para análise do hormônio 11ceto-Testosterona, utilizou-se “kit” comercial de Elisamunoensaio para 11ceto-Testosterona (EIA 582751 – *Cayman Chemical Company, INC*), contendo:

- 01 padrão para 11ceto-Testosterona (10ng/ml);
- 01 AChE Tracer para 11ceto-Testosterona;
- 01 Antisoro para 11ceto-Testosterona;
- 01 Buffer Concentrado de 11ceto-Testosterona;
- 01 Corante Tracer Dye;
- 01 corante antisoro Dye;
- 01 Reagente Ellman's;
- 01 Corante Tween 20;
- Solução de lavagem;
- Placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, nas quais são colocadas as amostras, totalizando 96 poços.

1.3.1. Preparação dos Reagentes

- **Buffer Concentrado de 11ceto-Testosterona**

Adicionar 10ml de Buffer em 90ml de água deionizada. Estocar a 4°C por até dois meses.

- **Solução de Lavagem**

Diluir 5ml da solução de lavagem em um volume total de 2L de água deionizada adicionando 1ml de Tween 20. O Tween 20 é um material viscoso e o volume desejado deve ser coletado com uma seringa.

- **Reagente Ellman's**

Reconstituir o frasco do reagente Ellman's em 20ml de água deionizada. A preparação deste reagente deverá ser feita somente na hora do ensaio, no momento de adicionar esse reagente na placa de Elisa.

- **Diluição do Padrão**

Preparar uma solução mãe com 100ul do padrão de 11ceto-Testosterona com 900ul de água deionizada. A solução mãe pode ser estocada a 4°C e estará estável por duas semanas. Numere oito tubos de ensaio.

No tubo 01, coloque 900ul de Buffer adicionando 100ul da solução padrão mãe, totalizando assim um volume de 1ml. No tubo 2, coloque 500ul de Buffer e transfira 500ul do tubo 01 para o tubo 02. No tubo 03, coloque 500ul de Buffer e transfira 500ul do tubo 02 para o tubo 03. Repita essa operação até o tubo 08. Ao final, as concentrações dos tubos serão: 100pg/ml (tubo 01); 50 pg/ml (tubo 02); 25 pg/ml (tubo 03); 12,5 pg/ml (tubo 04); 6,25 pg/ml (tubo 05); 3,13 pg/ml (tubo 06); 1,56 pg/ml (tubo 07) e 0,78 pg/ml (tubo 08) de 11ceto-Testosterona.

- **Ache Tracer de 11ceto-Testosterona**

Reconstituir o AchE tracer em 6ml de Buffer e adicionar 60ul do corante Tracer Dye para facilitar a visualização das tiras.

- **Antisoro de 11ceto-Testosterona**

Reconstituir o antisoro para 11ceto-Testosterona em 6ml de Buffer e adicionar 60ul de corante Antisoro Dye para facilitar a visualização das tiras.

1.3.2. Procedimento

As amostras foram descongeladas até atingir temperatura ambiente e homogeneizadas para o início do procedimento da análise.

O suporte com as tiras foi marcado para posterior identificação das amostras, colocando nas primeiras cavidades, 50µl dos 08 padrões previamente preparado (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 pg/ml) e 50ul de amostra no restante das cavidades. Essa análise foi feita em duplicata para os padrões e para as amostras.

Foi adicionado 50µl de AchE Tracer e 50ul de antisoro em todas as cavidades e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada, desprezando-se o conteúdo da placa, e adicionando 300µl de solução de lavagem em cada cavidade. A lavagem foi realizada 5 vezes em cada poço.

Após a lavagem, foi adicionado 200ul da solução Ellman's em todas as cavidades. Essa solução deve ser preparada neste momento.

A placa foi coberta com papel alumínio e incubada por 60~90 minutos. Ler em leitora de microplaca de Elisa (Molecular Devices,, modelo SpectraMax 250) a um comprimento de onda de 450nm.